

AUS DEM
INSTITUT FÜR TOXIKOLOGIE
AN DER HEINRICH-HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

DIREKTOR: PROF. DR. REGINE KAHL

Untersuchung der Wirkungen von Flavonoiden in
kultivierten Hepatomazellen
und in
Caenorhabditis elegans
als neu etabliertem *in vivo* Modell

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia Legendi für Toxikologie an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Dietmar Andreas Kampkötter

2007

(Veröffentlichung August 2008)

DIESE ARBEIT IST MEINER FRAU CLAUDIA, MEINEN SÖHNEN NIELS UND
LARS SOWIE MEINEN ELTERN GEWIDMET

Danksagungen

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Regine Kahl für die Möglichkeit, diese Arbeiten in ihrem Institut durchzuführen, für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und für ihre Unterstützung auch bei der Umsetzung neuer Ideen.

Meinen Kollegen Frau Dr. Yvonne Chovolou und Herrn Dr. Wim Wätjen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen fruchtbaren wissenschaftlichen Gespräche. Ich möchte mich aber auch für die Plaudereien im Kaffeeraum bedanken, die in hektischen Zeiten für etwas Entspannung sorgten.

Weiterhin gilt mein Dank auch allen Doktoranden, Diplomanden, Praktikanten und TA-Schülern, die ich hier nicht alle namentlich erwähnen kann. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonders möchte ich Frau Ingrid Köhler danken, die mich durch ihre jahrelange ausgezeichnete Arbeit unterstützt hat.

Frau Martina Bondorf und Frau Maria Anna Niermann-Kaiser danke ich ebenfalls für ihre kompetente Hilfe.

Bei allen anderen Mitgliedern des Instituts möchte mich für die (meist) gute Stimmung, die netten Gespräche und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Frau Claudia bedanken, die mir in anstrengenden Zeiten Kraft gab und mich jederzeit unterstützte, zeitweise sogar tatkräftig als eine kompetente Mitarbeiterin.

Meinen Söhnen Niels und Lars danke dafür, dass sie mich regelmäßig an die „anderen wichtigen Dinge“ abseits des Laboralltags erinnert haben, und für ihr Verständnis, wenn der „Papa“ mal wieder länger arbeiten musste.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	6
3. Darstellung und Diskussion der Ergebnisse.....	8
3.1 Etablierung von <i>C. elegans</i> als Testsystem zur Untersuchung der enzymatischen und nicht-enzymatischen Protektion gegen oxidativen Stress	8
3.1.1 Funktionale Untersuchung einer Glutathion S-Transferase des Humanparasiten <i>Onchocerca volvulus</i>	10
3.1.2 Funktionale Untersuchung einer Glutathion S-Transferase aus <i>C. elegans</i>	11
3.1.3 Etablierung von Endpunkten zur Untersuchung protektiver Wirkungen von Flavonoiden (z. T. mit EGb761)	13
3.2 Untersuchung der Wirkungen ausgewählter Flavonoide	18
3.2.1 Wirkung von Quercetin in kultivierten Ratten-Hepatomazellen und in <i>C. elegans</i>	18
3.2.2 Wirkung von Rutin in kultivierten Ratten-Hepatomazellen und in <i>C. elegans</i>	25
3.2.3 Wirkung von Kaempferol und Fisetin in kultivierten Ratten-Hepatomazellen und in <i>C. elegans</i>	28
3.2.4 Wirkung von Soja-Isoflavonen in kultivierten Hepatomazellen aus Ratte und Mensch.....	34
4. Literaturverzeichnis.....	39
5. Lebenslauf.....	45
6. Ausgewählte Original- und Übersichtsartikel	47

1. Einleitung

Höhere Pflanzen enthalten neben ihren Hauptnährstoffen (Proteine, Kohlenhydrate, Lipide etc.) aus dem Sekundärstoffwechsel stammende Substanzen, die zwar keine Energie liefern, aber dennoch biologische Funktionen übernehmen und daher als sekundäre oder nicht-nutritive bioaktive Pflanzeninhaltsstoffe bezeichnet werden. In der Pflanze wirken sie unter anderem als Abwehrstoffe gegen Schädlinge, als Lock- und Duftstoffe und als Farbstoffe gegen Schäden durch UV-Strahlung.

Zu den sekundären oder nicht-nutritiven bioaktiven Pflanzeninhaltsstoffen gehört auch die Gruppe der Flavonoide (von *flavus*, lat.: gelb), deren Grundgerüst aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen (A, B) und einem O-heterozyklischen Ring (C) besteht (Abb. 1.1). Die mehr als 6.000 bisher identifizierten Flavonoide werden

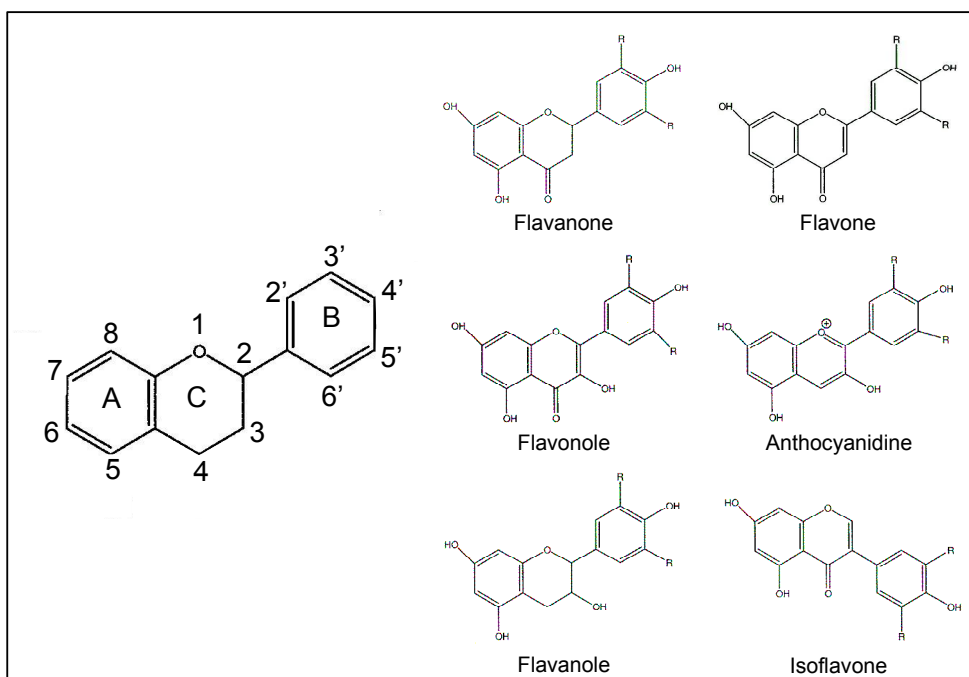


Abbildung 1.1:
Das Grundgerüst und einige Subgruppen der Flavonoide

anhand ihrer strukturellen Unterschiede im Ring C in verschiedene Subgruppen unterteilt, von denen einige in Abb. 1.1 mit ihrer Struktur dargestellt sind. Innerhalb der Subgruppen sind an verschiedenen Positionen des Grundgerüsts funktionelle Gruppen substituiert (z. B. Hydroxy- und Methylgruppen). Zudem liegen die Flavonoide meist in glykosylierter Form vor, wobei ca. 80 glykosidische Reste bekannt sind, so dass sich die hohe Zahl an unterschiedlichen Flavonoid-Derivaten erklärt.

In den Pflanzen ist die Synthese der Flavonoide abhängig vom Sonnenlicht und die höchsten Konzentrationen finden sich an der Blattoberseite und der Schale von Früchten [1]. Da viele Pflanzen als Lebensmittel dienen, werden Flavonoide von Menschen (und Tieren) mit der Nahrung aufgenommen. Dabei variiert die auf-

genommene Menge in Abhängigkeit von den Ernährungsgewohnheiten, dem Wohnort und der Jahreszeit. Für ausgesuchte Flavonoide wurden in verschiedenen Ländern tägliche Aufnahmemengen zwischen 20 und 73 mg Flavonoid ermittelt [2]. Das Flavonol Quercetin und seine Glykosid-Derivate (z. B. Rutin) sind dabei die mengenmäßig bedeutendsten Vertreter der Flavonoide in Nahrungs- und Heilpflanzen [3, 4]. Quercetin liegt in besonders hohen Mengen in Zwiebeln vor, aber auch in Äpfeln, Aprikosen, Broccoli, schwarzen Johannisbeeren und roten Weintrauben findet sich viel Quercetin [5]. Als weitere Flavonole sind Kaempferol (z. B. in Broccoli, Endiviansalat und Kohl) und Fisetin (z. B. in Weintrauben, Erdbeeren und Tomaten) in zahlreichen pflanzlichen Lebens- und Heilmitteln enthalten. Das Isoflavon Daidzein kommt überwiegend in Leguminosen vor und stellt im Soja zusammen mit dem Genistein das Hauptflavonoid dar.

Erste Hinweise auf den Einfluss der Ernährungsweise auf die Gesundheit wurden in den 1950er-Jahren gefunden und führten zur Initiation der sogenannten „Sieben-Länder-Studie“, die bis heute eine der umfangreichsten Erhebungen zum Zusammenhang zwischen Ernährung und Ätiologie verschiedener Krankheiten darstellt [6]. Auch in weiteren Studien (z. B. Lyon-Heart-Studie) konnten positive Gesundheitswirkungen einer Ernährung reich an Obst, Gemüse und Nüssen nachgewiesen werden [7]. Ebenfalls durch epidemiologische Studien wurde erkannt, dass die Frequenz von ischämischen Herzerkrankungen in Frankreich deutlich geringer war als in anderen europäischen und englisch-sprachigen Ländern, obwohl die Lebensweisen relativ vergleichbar waren [8]. Dieses als „*French Paradox*“ bezeichnete Phänomen wurde schließlich auf den in Frankreich üblichen regelmäßigen, aber moderaten Konsum von Rotwein zurückgeführt [9]. Da sich Rotwein vor allem durch seine hohe Konzentration an Polyphenolen – Resveratrol und verschiedenen Flavonoiden – von allen anderen alkoholischen Getränken unterscheidet, geriet diese Substanzgruppe als möglicher Auslöser der gesundheitsförderlichen Effekte in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses.

Viele Flavonoide weisen eine chemische Struktur auf, die ihnen die Fähigkeit verleiht, direkt mit radikalischen Molekülen zu reagieren und diese abzufangen. Weiterhin können sie Kationen wie Cu^{2+} und Fe^{3+} komplexieren und dadurch oxidative Prozesse unterbinden (z. B. Fenton-Reaktion). Diese antioxidative Kapazität wurde in der Vergangenheit häufig als entscheidend für die Wirkungen der Flavonoide betrachtet. Diese Betrachtungsweise wurde in letzten Jahren jedoch zunehmend kritisch diskutiert und die wissenschaftliche Meinung tendiert aktuell zu der These, dass die Beeinflussung von zellulären Abläufen durch Interaktion mit Proteinen (Enzymaktivierung oder -hemmung) einen mindestens gleich großen Beitrag zur Wirkung der Flavonoide leistet wie ihre direkten antioxidativen Eigenschaften [10, 11]. Betroffen von solchen Effekten sind u. a. zelluläre Signalprozesse (z. B. PI3-Kinase, Akt/PKB, Tyrosin-Kinasen und MAP-Kinasen), der Fremdstoffmetabolismus (z. B. Cytochrom P450) und die Integrität der genomischen DNA (Reparaturenzyme, Topoisomerasen). Neben der direkten antioxidativen Wirkung ist somit auch ein indirekter antioxidativer Einfluss denkbar, der über die

Veränderung der Expression von schützenden und reparierenden Enzymen vermittelt wird [12].

In einer Vielzahl an experimentellen Arbeiten wurden verschiedene gesundheitsförderliche Wirkungen der Flavonoide festgestellt. So wurden kardioprotektive, immunmodulatorische, antimikrobielle, antivirale und antikanzerogene Eigenschaften für bestimmte Flavonoide nachgewiesen [13]. Aber auch gesundheitsschädliche Effekte wie z. B. Störung der hormonellen Balance, Hemmung des Fremdstoffmetabolismus und Auslösung von Tumoren wurden für einzelne Flavonoide beschrieben [11]. Welche spezifische Wirkung auf ein biologisches System letztendlich ausgeübt wird, ist dabei in hohem Maß vom jeweiligen Flavonoid, der untersuchten Spezies, dem Organ bzw. dem Zelltyp und der eingesetzten Konzentration abhängig.

Im Vergleich mit den *in vitro* beobachteten Effekten der Flavonoide sind die Effekte limitierter, die *in vivo* gefunden wurden. Dies ist dadurch bedingt, dass keine validierten Biomarker verfügbar sind, Langzeit-Studien fehlen und die Bioverfügbarkeit bei der Konzeption häufig nicht ausreichend berücksichtigt wurde [14]. Weiterhin sind Studien an Menschen oder (mammalischen) Versuchstieren sehr kosten- und zeitintensiv, so dass die Untersuchung der Flavonoid-Wirkung mit solchen Ansätzen nur einen kleinen Teil aus dem breiten Spektrum der bekannten Flavonoide abdecken kann. Bei *in vitro* Experimenten mit Zellkulturen sind diese Nachteile nicht gegeben. Hierbei tritt jedoch das Problem auf, dass die jeweiligen Daten nur einen Ausschnitt der „biologischen Wirklichkeit“ wiedergeben, da die Ergebnisse u. U. nur für das verwendete Zellsystem Gültigkeit haben. Auch können physiologische Interaktionen zwischen verschiedenen Geweben und Organen bei der Wirkung der Flavonoide mit solchen Ansätzen nicht erfasst werden.

Um die system-bedingten Nachteile der *in vivo* Tiermodelle auf der einen Seite und der *in vitro* Zellkultur auf der anderen Seite zu umgehen, wird in zunehmenden Maß der Nematode *Caenorhabditis elegans* (Abb. 1.2) als Modell zur Untersuchung von biologischen, medizinischen und pharmakologischen Fragestellungen (in Ergänzung zu den etablierten Systemen) eingesetzt [15-18]. Diese wachsende Popularität ist durch die ausgezeichnete Eignung von *C. elegans* als Modellorganismus begründet. Die Würmer sind unter Laborbedingungen einfach zu kultivieren und können sowohl auf Fest- als auch in Flüssigmedium gehalten werden, wobei als Nahrungsquelle *E. coli* Bakterien dienen. Die Kryokonservierung über lange Zeiträume ist ebenfalls möglich [19]. Die hohe Reproduktivität (ca. 300 Nachkommen pro Wurm) und die kurze Generationszeit (ca. 3 Tage von der Eiablage bis zum adulten Tier) erlaubt das schnelle Anzichten von Populationen. Dabei ist es einfach, homozygote Stämme zu gewinnen und beizubehalten, weil die Würmer in der Regel hermaphroditisch sind und sich über Selbstbefruchtung vermehren. Genetische Rekombinationen können aber trotzdem durch Kreuzung von Hermaphroditen mit den sporadisch auftretenden Würmern männlichen Geschlechts (ca. 0,05% Männchen) durchgeführt werden [20]. Weiterhin wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass ein hoher Grad an Konserviertheit in vielen biologischen Prozessen zwischen *C. elegans* und

Säugetieren gegeben ist – für mehr als 60% der humanen Gene wurden Homologe in *C. elegans* identifiziert [21, 22]. Einige wichtige Entdeckungen in biologisch und humanmedizinisch relevanten Gebieten wurden zunächst in *C. elegans* gemacht. Hervorzuheben sind hierbei die Bereiche der Entwicklungsbiologie und der Alterungsforschung, in denen die Arbeit mit *C. elegans* grundlegende Erkenntnisse hervorbrachte und wichtige Impulse für weitere Forschungen auch am Säuger bzw. am Menschen gab. Für ihre entwicklungsbiologischen Pionierarbeiten wurden

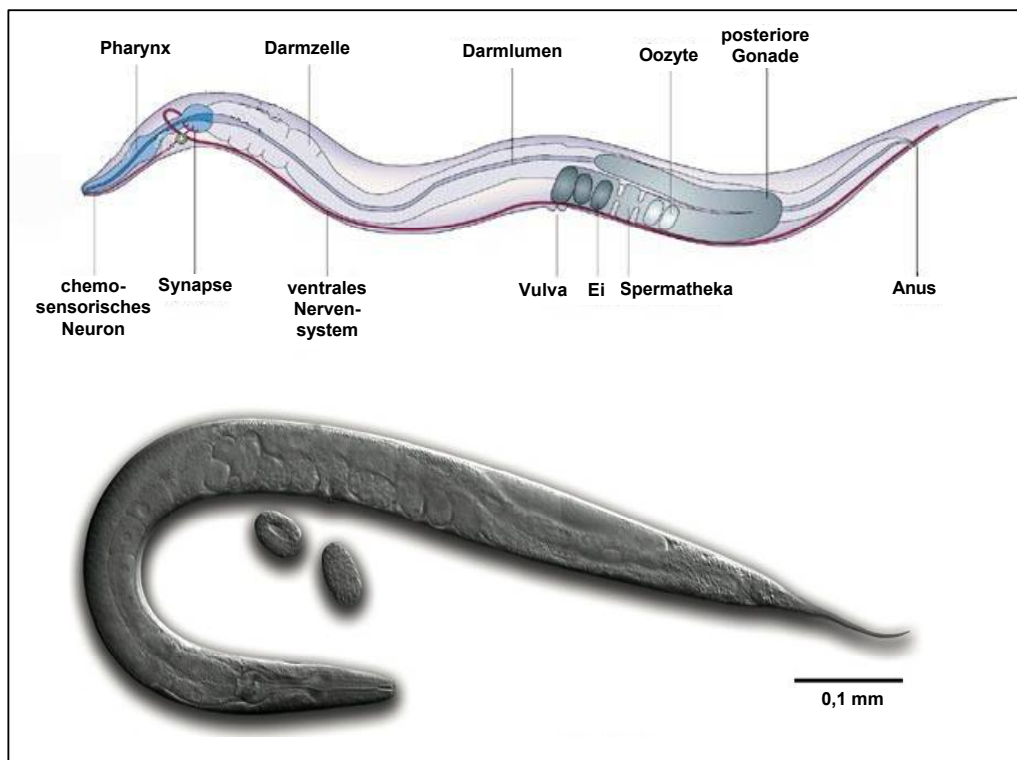


Abbildung 1.2:

Schematische Abbildung und lichtmikroskopische Aufnahme von *C. elegans*. (modifiziert nach [17])

Sydney Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulston 2002 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Mit der Entdeckung der ersten langlebigen *C. elegans* Mutante Ende der 1980-er Jahren begann die Alterungsforschung in *C. elegans* [23]. In der Folgezeit wurden zahlreiche weitere lang- und kurzlebige Mutanten gefunden und molekular charakterisiert. Die Suche nach solchen Mutanten wurde dabei durch die kurze Lebensspanne der Würmer erleichtert, die im Wildtyp nur zwei bis drei Wochen beträgt. Durch die vergleichsweise einfache genetische Manipulierbarkeit der Würmer können auch leicht mutante und transgene Stämme als Modelle u. a. für metabolische, neurodegenerative und genetische Erkrankungen des Menschen erzeugt werden [17]. Für die Suche nach neuen Ansatzpunkten (*targets*) für pharmakologische Interventionen und nach neuen Wirkstoffen zur Therapie dieser Krankheiten ist die geringe Größe der adulten Würmer (ca. 1 mm Länge) von Vorteil. Sie können in Mikrotiter-Platten gehalten werden und sind daher auch für den Einsatz in Mittel- und Hochdurchsatzverfahren geeignet [24, 25]. Obwohl

hermaphroditische Würmer nur aus genau 959 somatischen Zellen aufgebaut sind (Zellkonstanz), bilden diese wenigen Zellen zahlreiche Gewebe und Organe einschließlich Muskeln, Hypodermis, Verdauungstrakt, Drüsen, Reproduktions- und Nervensystem. Ein solch komplexes physiologisches System bietet die Möglichkeit, bei der Untersuchung von pharmakologisch aktiven Substanzen nicht nur die gewünschte oder erwartete Wirkung an der Zielstruktur zu beobachten, sondern auch möglicherweise auftretende Einflüsse auf andere Ansatzpunkte (*off target* Effekte) zu erfassen. Aufgrund der transparenten Erscheinung von *C. elegans* können hierbei auch Störungen der Entwicklung von Organen und Geweben in embryonalen und larvalen Stadien erkannt werden. Die Transparenz ermöglicht zusätzlich die mikroskopische Beobachtung von Fluoreszenz-gekoppelten Markern, so dass die zeitlichen und räumlichen Expressions- und Verteilungsmuster von Reporterproteinen in lebenden Tieren untersucht werden können.

Erst in den letzten Jahren wurde damit begonnen, die oben beschriebenen Vorteile von *C. elegans* auch zur Charakterisierung pharmakologischer Wirkungen von Pflanzeninhaltsstoffen und -extrakten auszunutzen, und bisher haben erst drei Arbeitsgruppen entsprechende Studien veröffentlicht. Luo und seine Mitarbeiter haben die Effekte des standardisierten *Ginkgo biloba* Extrakts EGb761 erforscht, der in der Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen (u. a. Alzheimer-Krankheit) eingesetzt wird und verschiedene Flavonoide enthält. Sie konnten zeigen, dass dieses Phytopharmakon – vermutlich als Folge seiner antioxidativen Wirkung – in wildtypischen Würmern zu einer gesteigerten Stressresistenz und zu einer verlängerten Lebensspanne führt [26-28]. Außerdem ergeben ihre Experimente mit transgenen Würmern, die konstitutiv das pathogene humane Amyloid β -Peptid exprimieren und als Modell für die Alzheimer Erkrankung dienen, starke Hinweise darauf, dass der *Ginkgo*-Extrakt, das Soja-Isoflavon Glycitein und Epigallocatechingallat aus grünem Tee ein therapeutisches Potential zur Vorbeugung und Behandlung dieser Krankheit aufweisen [29-32]. Wood *et al.* wiesen nach, dass das im Rotwein enthaltene Polyphenol Resveratrol und andere „Sirtuin aktivierende Substanzen“ die Lebensspanne von *C. elegans* verlängern. Dabei wirken diese Substanzen wahrscheinlich über spezifische Interaktionen mit der Histon-Deacetylase SIR-2.1 und nicht (nur) über ihre antioxidative Aktivität [33]. Auch Wilson *et al.* beschreiben protektive und lebensverlängernde Wirkungen von Fraktionen eines Polyphenol-haltigen Blaubeer-Extraktes, die sie nicht auf eine antioxidative Wirkung zurückführen [92].

Die Ergebnisse dieser wenigen Studien unterstützen die oben beschriebene These, dass die antioxidative Aktivität nicht die alleinige Wirkkomponente der Flavonoide bzw. Polyphenole darstellt und noch zusätzliche spezifische Mechanismen bei der Auslösung von (protektiven) pharmakologischen Effekten eine bedeutende Rolle spielen.

2. Zielsetzung

Flavonoide sind polyphenolische Verbindungen, die in höheren Pflanzen den mengenmäßig größten Anteil der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe ausmachen. Aufgrund ihrer weiten Verbreitung sind sie in vielen Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs enthalten und somit ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung.

Epidemiologische Befunde deuten darauf hin, dass eine flavonoidreiche Ernährungsweise einen positiven Einfluss auf die Gesundheit hat. Hierbei wird vor allem ein schützender Effekt auf das Herz-Kreislauf-System und eine antikanzerogene Wirkung postuliert. Die antioxidative Aktivität vieler Flavonoide gilt dabei als eine wichtige Wirkkomponente. Es werden aber auch zahlreiche andere pharmakologische Eigenschaften – z. B. die Interaktion mit zellulären Signalprozessen – in diesem Zusammenhang diskutiert. Die meisten Untersuchungen von Flavonoiden werden *in vitro* an kultivierten Zellen durchgeführt, und es hat sich

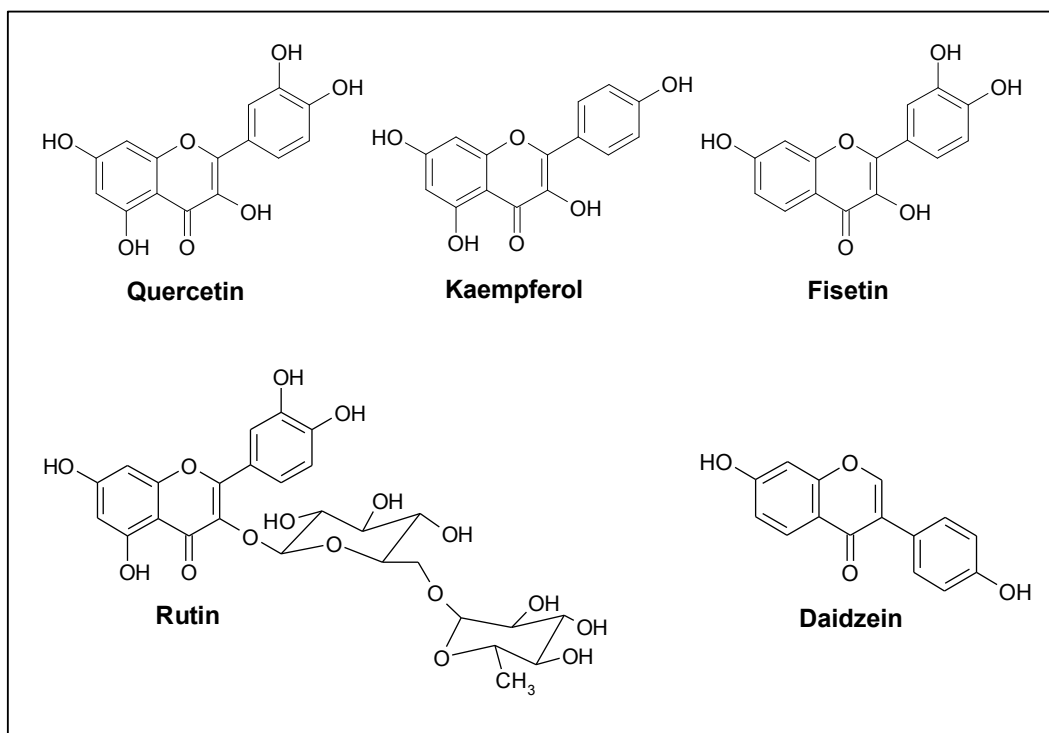


Abbildung 2.1:
Struktur der untersuchten Flavonoide.

herausgestellt, dass die Wirkung stark von dem jeweiligen Flavonoid, der eingesetzten Konzentration und dem verwendeten Zelltyp abhängig ist. Wegen des hohen Aufwands bei der Durchführung klassischer tierexperimentellen Studien (z. B. Maus oder Ratte) sind die Einflüsse von Flavonoiden in einem Gesamtorganismus bisher wesentlich schlechter erforscht. Die Datenlage zur Wirkung dieser Substanzen in komplexen physiologischen Systemen ist daher vergleichsweise unergiebig.

Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der sehr gut charakterisierte und leicht zu handhabende Nematode *Caenorhabditis elegans* als *in vivo* Modell zur Untersuchung der Flavonoidwirkung etabliert werden. Dieser Ansatz versteht sich als eine Ergänzung zu Arbeiten an kultivierten Hepatomazellen aus der Ratte und dem Menschen. Die Einflüsse ausgesuchter Flavonoide (Abb. 2.1) sollten sowohl auf beschreibender als auch auf mechanistischer Ebene analysiert werden, wobei die jeweiligen Stärken der beiden Systeme ausgenutzt wurden. So wurde die Aufnahme der Flavonoide, die eine Grundvoraussetzung für eine systemische Wirkung darstellt, in Zellen und in *C. elegans* überprüft und ggf. vorkommende Metabolite wurden identifiziert. Zur Abschätzung von protektiv und advers wirkenden Konzentrationsbereichen wurden die Zellen unterschiedlichen Flavonoid-Dosierungen ausgesetzt und die Auswirkung dieser Behandlung auf die Resistenz gegen oxidativen Stress, die Zytotoxizität und die Induktion von Apoptose wurde untersucht. Als Indikator für einen möglichen gesundheitsförderlichen Effekt wurden Einflüsse von Flavonoiden in nicht toxischer Konzentration auf die Empfindlichkeit von *C. elegans* gegen Stressbedingungen und die Lebensspanne der Würmer beobachtet. Die Analyse einer möglichen Veränderung der Expression protektiver Enzyme in Zellen und Würmern sollte zu einem besseren Verständnis der Wirkweise dieser Substanzen beitragen. Zu diesem Zweck wurde auch der Einfluss auf die zelluläre Signaltransduktion in *C. elegans* untersucht.

3. Darstellung und Diskussion der Ergebnisse

3.1 Etablierung von *C. elegans* als Testsystem zur Untersuchung der enzymatischen und nicht-enzymatischen Protektion gegen oxidativen Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) entstehen in allen aeroben Zellen durch die unvollständige Reduktion von Sauerstoff in der mitochondrialen Atmungskette und als Nebenprodukte normaler metabolischer Reaktionen im Zytoplasma, im Endoplasmatischen Retikulum, in der Plasmamembran und in den Peroxisomen [34-36]. Auch bestimmte Chemikalien, z. B. sogenannte Redox-Cycler und Metallionen, sowie Umweltfaktoren, wie z. B. Strahlung, UV-Licht und Hitze, führen zur Bildung von ROS [37-40]. In geringen Konzentrationen beeinflussen ROS als intra- und interzelluläre Botenstoffe Signalmoleküle und sind somit an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse beteiligt [41].

Aufgrund ihrer hohen Reaktivität können ROS in höherer Menge jedoch auch zelluläre Moleküle (z. B. DNA, Proteine, Lipide) angreifen und irreversibel schädigen. Die hierbei entstehenden oxidativen Reaktionsprodukte können ebenfalls hochreaktiv sein und weitere zelluläre Moleküle schädigen, so dass eine sich selbst verstärkende Kettenreaktion in Gang gesetzt wird [42, 43].

Da dies letztendlich zum Verlust der zellulären Funktionalität führen würde, weisen aerobe Organismen enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen gegen ROS auf (*Abb. 3.1*). Das enzymatische Schutzsystem gliedert sich grob in zwei Phasen. In der ersten Phase werden die ROS von Enzymen wie den Superoxid-Dismutasen (SOD) und der Katalase direkt abgebaut. Die SODs dismutieren dabei das Superoxidanionradikal ($O_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das von der Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt wird. In Folge eines nicht ausreichenden Abfangens der ROS durch diese Reaktionen oder als Resultat der enzymatischen Aktivität anderer Phase I-Enzyme (z. B. Cytochrom P450 Proteine) können trotzdem oxidative Reaktionsprodukte entstehen [44, 45], die von den Enzymen der Phase II entgiftet werden [45]. Neben vielen anderen Enzymen spielen bei diesem Prozess die Glutathion S-Transferasen (GST) eine wichtige Rolle, indem sie die Konjugation von Glutathion (GSH) an verschiedene oxidative Reaktionsprodukte wie ungesättigte Aldehyde, Chinone, Epoxide und Hydroperoxide katalysieren, wodurch diese der Elimination zugänglich werden [46, 47].

GSH stellt als endogenes Antioxidans auch einen wesentlichen Bestandteil des nicht-enzymatischen Schutzsystems dar, da es viele reaktive Substanzen reduzieren kann und sie unter Bildung von Glutathiondisulfid (GSSG) in weniger reaktive Verbindungen umwandelt [48]. Auch einige Vitamine, wie z. B. α -Tocopherol und

Ascorbinsäure, wirken aufgrund ihrer Radikalfänger-Aktivität als niedermolekulare Antioxidantien.

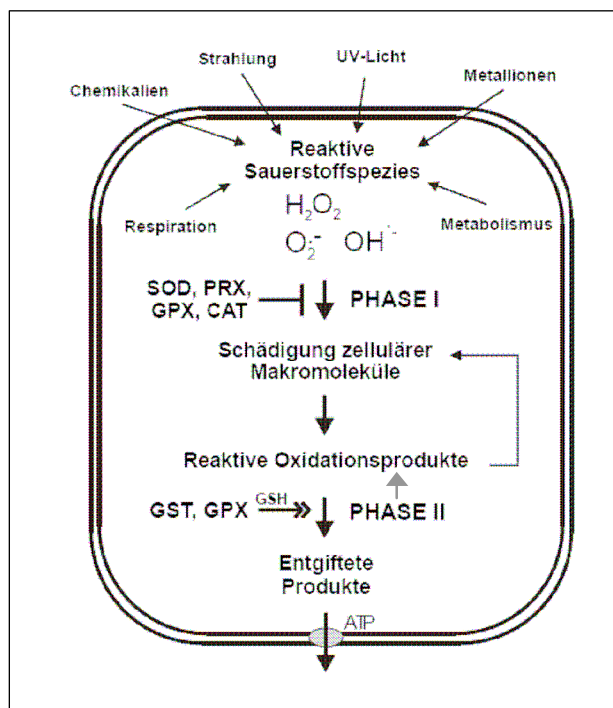


Abbildung 3.1:

Die Entstehung von ROS und enzymatische Schutzmechanismen. CAT: Katalase, GPX: Glutathionperoxidase, GSH: Glutathion, GST: Glutathion S-Transferase, PRX: Peroxiredoxin, SOD: Superoxid-Dismutase (modifiziert nach [47]).

Oxidativer Stress liegt vor, wenn sich das Gleichgewicht zwischen der Bildung von ROS und oxidativen Reaktionsprodukten durch endogene und exogene Einflüsse einerseits und dem Abbau der reaktiven Substanzen durch die Schutzsysteme andererseits zu Gunsten der Oxidantien verschiebt ([46]). Die Folgen können Mutationen im Genom, Chromosomenaberrationen, der Verlust enzymatischer Protein-Aktivität sowie die Aufhebung der Membranintegrität sein. Je nach Schwere der Schädigungen und der Fähigkeit zur Reparatur der Schäden kann eine Zelle ihre Funktionen nur noch eingeschränkt oder auch gar nicht mehr wahrnehmen ([49]).

Für die Pathophysiologie zahlreicher, meist alters-assoziierter Krankheiten wird oxidativer Stress bzw. die resultierenden Schädigungen als eine entscheidende Ursache angesehen. Bei Krankheiten wie z. B. der Atherosklerose und der rheumatoiden Arthritis verursacht oder verstärkt der Überschuss an ROS die beteiligten Entzündungsprozesse. Die Entstehung von Mutationen und Chromosomenaberrationen durch die oxidative Schädigung von genomischer DNA wird als ein wesentlicher Faktor bei der Tumorentstehung angesehen. Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit) spielt

oxidativer Stress durch die Ausbildung von pathologischen Proteinaggregaten eine bedeutende Rolle ([42, 50-56]).

Nach der „Theorie der freien Radikale“ wird der Prozess des Alterns ebenfalls zumindestens teilweise durch oxidativen Stress ausgelöst [57]. Diese allgemein akzeptierte Theorie basiert auf der Beobachtung, dass es mit steigendem Lebensalter zu einer Akkumulation von zellulären Schäden kommt, die durch freie Radikale bzw. ROS hervorgerufen werden [49]. Die Mitochondrien sind besonders stark von der oxidativen Schädigung betroffen, da in diesen Organellen besonders viele ROS gebildet werden (Atmungskette), aber nur verhältnismäßig schlecht ausgeprägte Schutz- und Reparatursysteme vorhanden sind [58]. Als Folge nimmt die Effizienz der mitochondrialen Atmungskette ab [59-61], so dass die zelluläre Energiegewinnung beeinträchtigt wird. Der hieraus resultierende Mangel an verfügbarer Energie beeinträchtigt die zellulären Schutz- und Reparaturmechanismen und in einer Art positiver Rückkopplung manifestieren sich vermehrt oxidative Schäden – ein Prozess, der zu einem zunehmenden Verlust der zellulären Funktionen führt und als eine der Hauptursachen für das Altern angesehen wird [62, 63].

3.1.1 Funktionale Untersuchung einer Glutathion S-Transferase des Humanparasiten *Onchocerca volvulus*

Organismen mit einer parasitischen Lebensweise benötigen besonders effektive antioxidative Schutzsysteme, da sie im Zuge der Immunabwehr des Wirts einer Vielzahl von reaktiven Verbindungen und ROS in hoher Dosis ausgesetzt sind. Dies gilt besonders für langlebige Parasiten, die chronische Infektionen verursachen, wie den humanparasitischen Nematoden *Onchocerca volvulus*.

In *O. volvulus* sind drei GSTs identifiziert (*Ov*-GST-1 bis -3; [64-67]), von denen die *Ov*-GST-3 (NCBI: AAF99575) durch oxidativen Stress auf Transkriptionsebene stark heraufreguliert wird. Interessanterweise ist das Ausmaß der Induktion stark von der Natur des artifiziell erzeugten oxidativen Stresses abhängig: bei intrazellulärem oxidativen Stress erfolgt nur eine moderate Induktion der Transkription, während durch externen oxidativen Stress eine deutlich stärkere Zunahme ausgelöst wird [66]. Dieser Unterschied in der Reaktion führte zu der Vermutung, dass die *Ov*-GST-3 eine wichtige Rolle bei der Verteidigung des Parasiten gegen die vom Immunsystem des Wirts freigesetzten ROS spielt.

Da *O. volvulus* unter Laborbedingungen nicht kultiviert werden kann und keine genetischen Manipulationen an diesem Organismus durchgeführt werden können, bestand keine Möglichkeit, die Funktion der *Ov*-GST-3 in diesem Parasiten zu untersuchen. Um dennoch die Proteinfunktion *in vivo* aufzuklären, wurden transgene *C. elegans* Stämme hergestellt (XA8400, nach alter Nomenklatur AK1), die die parasitäre *Ov*-GST-3 heterolog exprimierten und somit die funktionelle Untersuchung

dieses Proteins in Bezug auf die vermittelte Resistenz gegen oxidativen Stress erlaubten (*Publikation 11*).

Zur Erzeugung von intrazellulärem Stress wurde das redox-aktive Chinon Juglone (5-Hydroxy-1,4-Naphtochinon) verwendet. Diese aus Walnussbäumen gewonnene Substanz wird von den Zellen aufgenommen und in einer durch die zelluläre Diaphorase katalysierten Reaktion zu einem Semichinon-Radikal reduziert, das seinerseits Sauerstoff zum Superoxidanionradikal reduziert. Das Chinon wird über einen Redox-Zyklus regeneriert [68]. Ein externer oxidativer Stress wurde durch das Hypoxanthin/Xanthin-Oxidase System erzeugt. Die Xanthin-Oxidase katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin, wobei molekularer Sauerstoff als Elektronen-Akzeptor dient. So wird im flüssigen Umgebungsmedium H_2O_2 gebildet.

Die transgenen *C. elegans* Stämme zeigten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm eine gesteigerte Resistenz gegen intrazellulären oxidativen Stress und eine noch wesentlich stärker ausgeprägte Resistenz gegen externen oxidativen Stress. Zu einem Zeitpunkt (7,5 Stunden), an dem in beiden Behandlungsregimen alle wildtypischen Würmer gestorben waren, wiesen die transgenen Stämme unter intrazellulärem Stress eine Überlebensrate von ca. 30% auf und unter externem oxidativem Stress überlebten sogar mehr als 90% dieser Würmer.

Der kausale Zusammenhang zwischen der heterologen *Ov*-GST-3 Expression in den transgenen *C. elegans* Stämmen und der gesteigerten Stress-Resistenz wurde mit RNAi (*RNA interference*) Experimenten bewiesen. Durch die RNAi-Behandlung erhöhte sich die Empfindlichkeit der transgenen Würmer gegen beide Arten von oxidativem Stress und näherte sich dem Niveau der wildtypischen Würmer an.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die heterolog exprimierte *Ov*-GST-3 die Resistenz der transgenen Würmer besonders gegen externen oxidativen Stress deutlich erhöht. Dieses Ergebnis unterstützt also die Vermutung, dass dieses Enzym eine Rolle bei der Verteidigung des Parasiten gegen die im Zusammenhang mit der Immunabwehr des (humanen) Wirtes freigesetzten ROS innehat.

C. elegans wurde hierbei erfolgreich als Modell zur funktionellen Untersuchung eines Proteins aus dem Humanparasiten *O. volvulus* eingesetzt, das sich ansonsten aufgrund der Unzugänglichkeit dieses Organismus nicht hätte *in vivo* charakterisieren lassen. Eine solche methodische Vorgehensweise zur Aufklärung der Funktion von Proteinen aus Parasiten war zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente nicht weit verbreitet – es existierten nur drei Studien mit vergleichbarer Methodik [66, 69-71] –, so dass diese Arbeit auch zur Etablierung von *C. elegans* als Testsystem im Bereich der Parasitologie beigetragen hat [72].

3.1.2 Funktionale Untersuchung einer Glutathion S-Transferase aus *C. elegans*

Ähnlich wie für die *Ov*-GST-3 aus dem Parasiten *O. volvulus* wurde auch für die GST-4 aus *C. elegans* (NCBI: AAB65417) eine Induktion der Expression nach

Exposition der Würmer gegen oxidativen Stress festgestellt [73]. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass auch dieses Protein an der Entgiftung von oxidativ geschädigten zellulären Komponenten beteiligt ist und somit eine Schutzwirkung gegen oxidativen Stress besitzt.

Die rekombinant in Bakterien exprimierte GST-4 erkannte neben dem Universalsubstrat CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzol) und Cumolhydroperoxid als Indikator für eine Peroxidase-Aktivität auch das trans-2-Nonenal, das ein Produkt der Lipidperoxidation ist und somit einen Marker für oxidative Schäden an der Zellmembran darstellt (*Publikation 12*).

Zur weiteren Überprüfung der oben aufgestellten Vermutung wurde ein *C. elegans* Stamm generiert, der als Transgen die Sequenz des *gst-4* Gens inklusive 1000 Bp der Promotorregion in translationaler Fusion mit dem „Grün-fluoreszierenden Protein“ (*green fluorescent protein*, GFP) enthält. Würmer dieses BL1 genannten Stamms und eines anderen transgenen *C. elegans* Stammes mit einer Fusion aus dem *gst-4* Promotor (727 Bp) und dem GFP (CL2166, [74]) zeigten nach Behandlung mit den Chemikalien Plumbagin, Paraquat und Juglone, die alle nach dem oben beschriebenen Mechanismus (vgl. 3.1.1) intrazellulären oxidativen Stress erzeugen, eine Zunahme der GFP vermittelten Fluoreszenz. Durch Juglone wurde hierbei die stärkste Aktivierung des Promotors erzielt. Durch das System aus Hypoxanthin und Xanthin-Oxidase zur Erzeugung von externem oxidativem Stress (vgl. 3.1.1) wurde die Intensität der Fluoreszenz bzw. Aktivität des *gst-4* Promotors nicht beeinflusst. Aufgrund dieser Responsivität des *gst-4* Promotors kann die Fluoreszenzentwicklung in den BL1-Würmern als Biomarker für intrazellulären oxidativen Stress verwendet werden (*Publikationen 2-4*, [75]).

Im Gegensatz zum Transgen im Stamm XA8400 (*Ov*-GST-3 fusioniert an GFP; vgl. 3.1.1) vermittelte das *gst-4* Fusionskonstrukt nur eine Steigerung der Resistenz gegen intrazellulären oxidativen Stress (Juglone) und nicht gegen externen oxidativen Stress (Hypoxanthin/Xanthin-Oxidase). Diese Resistenzsteigerung wurde durch eine RNAi-Behandlung der transgenen Tiere reduziert. So wurde nachgewiesen, dass die erhöhte Resistenz auf die vermehrte Expression der GST-4 in dem transgenen Stamm zurückzuführen war. Nicht nur die transgen über-exprimierte, sondern auch die im Wildtyp gebildete Menge an endogener GST-4 schützte *C. elegans* vor oxidativem Stress bzw. vor zellulären oxidativen Schäden. Dies wurde durch den Vergleich einer Mutante mit einer homozygoten *gst-4* Deletion (RB1823), d. h. ohne GST-4 Enzymaktivität, und dem Wildtyp-Stamm gezeigt. Die mutanten Würmer reagierten erheblich sensibler auf oxidativen Stress (Juglone) und verstarben früher als wildtypische Tiere.

Zusammenfassend unterstützen die beschriebenen Ergebnisse die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die GST-4 aus *C. elegans* vor Schäden durch intrazellulär entstehenden oxidativen Stress schützt, wahrscheinlich indem sie beim Abbau der oxidativ geschädigten zellulären Bestandteile mitwirkt.

In dieser Arbeit wurde *C. elegans* als ein System verwendet, um die Funktionen eines wichtigen Enzyms des Phase II Metabolismus dieses Organismus bei der Abwehr von Schäden durch oxidativen Stress aufzuklären, indem u. a. transgene und mutante *C. elegans* Stämme eingesetzt wurden. Solche Stämme können mit vergleichsweise geringem Aufwand selbst hergestellt werden (s. Stamm BL1 und XA8400 in 3.1.1) oder sind über das „*Caenorhabditis Genetics Center*“ an der Universität von Minnesota (<http://www.cbs.umn.edu/CGC/>) kostenlos erhältlich. Dieser einfache Zugang zu entsprechenden Stämmen ist einer der Gründe für die Beliebtheit und die Eignung von *C. elegans* als Modellsystem zur Beantwortung von Fragestellungen in unterschiedlichen Bereichen der biologischen und medizinischen Forschung.

3.1.3 Etablierung von Endpunkten zur Untersuchung protektiver Wirkungen von Flavonoiden (z. T. mit EGb761)

In diesem Kapitel wird die Etablierung von geeigneten experimentellen Endpunkten im Modellsystem *C. elegans* zur Untersuchung protektiver Wirkungen von Flavonoiden beschrieben.

Der standardisierte Extrakt EGb761 aus den Blättern von *Ginkgo biloba* (Fa. Schwabe Arzneimittel, Karlsruhe) wird als Nahrungsergänzungsmittel sowohl zur Vorbeugung von Arteriosklerose als auch zur Aufrechterhaltung von kognitiven Funktionen eingesetzt und dient als Phytopharmakon bei der Therapie von Demenzerkrankungen einschließlich des Morbus Alzheimer [28, 76-78]. In *C. elegans* wurde gezeigt, dass dieser Extrakt protektiv wirkt, indem er die Resistenz gegen Stressbedingungen steigert [26, 27]. Aus diesem Grund wurde EGb761, der als wirksame Bestandteile u. a. auch die Flavonoide Quercetin, Kaempferol und Tamarixetin beinhaltet, für die Etablierung einiger hier dargestellter experimenteller Vorgehensweisen als positive Testsubstanz verwendet.

3.1.3.1 Thermotoleranz als Indikator für protektive Substanzwirkung

Die meisten langlebigen *C. elegans* Mutanten weisen auch eine erhöhte Resistenz gegen akute Stressoren wie z. B. oxidativen und thermalen Stress auf [79-81], so dass eine positive Korrelation zwischen den Endpunkten Langlebigkeit und Stressresistenz allgemein akzeptiert ist. Die Verwendung der Stressresistenz als Surrogat-Marker für den Einfluss einer genetischen Mutation oder einer Testsubstanz auf die Lebensspanne ist daher eine sinnvolle Vorgehensweise, um schneller und mit höherem Durchsatz Aussagen über (potentiell) protektive Substanzwirkungen z. B. von Flavonoiden treffen zu können [24, 82-84].

Um den Einfluss von Substanzen auf die Thermoresistenz von *C. elegans* vergleichsweise effizient untersuchen zu können, wurde eine Methode angewendet, bei der im Mikrotiterplatten-Format (384 Kavitäten) die Todeszeitpunkte einzelner Würmer bei letalem thermalen Stress (37°C) über eine automatisierte Messung der Fluoreszenzentwicklung in den einzelnen Kavitäten mit Hilfe des fluoreszenten Todfarbstoffes „SYTOX Green Nucleic Acid Stain“ (Fa. Molecular Probes) bestimmt werden können [85]. Mit diesem Assay wurde eine Zunahme der mittleren, medianen und maximalen Überlebenszeit durch die Behandlung der Würmer mit dem standardisierten Extrakt EGb761 um 12%, 8% bzw. 19% festgestellt (*Publikation 4*). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Studie von Wu *et al.* [26] und bestätigt somit die Eignung dieses methodischen Verfahrens zur Untersuchung des Einflusses von Substanzen auf die Thermotoleranz von *C. elegans*. Auch die beobachtete Verlängerung der Lebensspanne durch die EGb761 Behandlung belegt entsprechend der Korrelation zwischen Stressresistenz und Lebensspanne die Validität der Methode.

3.1.3.2 Messung der intrazellulären ROS-Akkumulation

Viele Flavonoide weisen eine antioxidative Aktivität auf, indem sie direkt Radikale abfangen und / oder das antioxidative Enzymsystem stimulierend beeinflussen. Für die Untersuchung der Wirkweisen von Flavonoiden ist es daher interessant, den Effekt der Substanzen auf die intrazelluläre ROS-Menge zu bestimmen. Hierzu wurde eine für Zellkulturen etablierte Methode, bei der die Menge an intrazellulären ROS über die Umsetzung von nicht-fluoreszentem H₂DCF-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat) zu fluoreszentem DCF gemessen wird, an die Verwendung von *C. elegans* im Mikrotiterplatten-Format (384 Kavitäten) angepasst. Durch die Behandlung mit dem *Ginkgo biloba* Extract EGb761 wurde die Zunahme der Fluoreszenzintensität in einzelnen lebenden Würmern bei thermalem Stress (37°C) im Vergleich zu Kontroll-Würmern verzögert (*Publikation 4*). Dies entsprach dem erwarteten Resultat, da EGb761 sowohl direkt als Radikalfänger als auch indirekt über die Hochregulation des antioxidativen Enzymsystems antioxidativ wirksam ist [28, 76, 78]. Auch bei *C. elegans* wurde mehrfach über eine Verringerung der intrazellulären ROS-Menge durch EGb761 berichtet [27, 29, 30]. In diesen Studien wurden allerdings Extrakte aus lysierten Würmern verwendet, so dass im Gegensatz zur hier beschriebenen Vorgehensweise die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz-Entwicklung während der Behandlung mit thermalem Stress nicht möglich war.

Zusätzlich zur Darstellung der Eignung der Methodik verdeutlicht das Ergebnis auch, dass die Hitze-Inkubation (37°C) zu einer fortschreitenden Zunahme der Menge an intrazellulären ROS führt, die wahrscheinlich für die Toxizität des thermalen Stresses mitverantwortlich ist.

3.1.3.3 GST-4 Expression als Marker für intrazellulären oxidativen Stress

Wie bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben wird die Expression der GST-4 durch oxidativen Stress bzw. durch oxidativ geschädigte Zellkomponenten gesteigert (*Publikationen 4 und 12*). Das Ausmaß dieser Induktion ist dabei von der Intensität des oxidativen Stresses abhängig. Flavonoide weisen möglicherweise über eine Radikalfänger-Aktivität direkte oder über Beeinflussung von Signalwegen bzw. Enzymsystemen indirekte antioxidative Eigenschaften auf. Da sie darüber ggf. einen Effekt auf die zelluläre Redox-Situation ausüben, wurde die Expression bzw. die Fluoreszenz des Fusionsproteins aus GST-4 und GFP im transgenen *C. elegans* Stamm BL1, die über den *gst-4* Promotor reguliert wird, als Marker für oxidativen Stress verwendet.

Zur Überprüfung der Eignung dieses Markers wurde erneut EGb761 als Testsubstanz eingesetzt, weil sich dieser Extrakt – wie zuvor beschrieben – bei thermalem Stress als antioxidativ und protektiv erwiesen hat. Die Verringerung des intrazellulären oxidativen Stresses ist hierbei in einem Kausalzusammenhang mit diesen Wirkungen zu sehen. Durch die Behandlung des transgenen Stammes mit EGb761 nahm die Fluoreszenz um 23% bei normalen Kulturbedingungen und um 35% bei intrazellulären oxidativen Stress (Juglone) ab. Es wurde somit das erwartete Ergebnis erzielt und demonstriert, dass die Fluoreszenzentwicklung im Stamm BL1 einen geeigneten Marker für oxidativen Stress in lebenden Würmern darstellt.

3.1.3.4 Expression des antioxidativen Enzyms SOD-3

Die *C. elegans* SOD-3 (NCBI: NP_510764) ist homolog zur mitochondrialen Mangan-SOD der Säuger und wird durch thermalen und oxidativen Stress induziert [73, 86] (*Publikation 1*). Auch in verschiedenen langlebigen *C. elegans* Mutanten wird die SOD-3 in verstärktem Maß gebildet [87, 88], so dass die Untersuchung des Einflusses von Flavonoiden auf die Expression dieses antioxidativen Enzyms einen weiteren geeigneten Endpunkt bei der Aufklärung ihrer Wirkweise darstellte.

Im Stamm CF1553 dient das Transgen, ein Konstrukt aus dem Promotor der SOD-3 und der Kodiersequenz der GFP, als ein Reporter, mit dem die Expression in lebenden Würmern analysiert werden kann [89].

3.1.3.5 Lipofuszin-Akkumulation als Marker für oxidative Degeneration

Lipofuszin entsteht durch die oxidative Degeneration von zellulären Komponenten und wird häufig auch als „Alterspigment“ bezeichnet, weil es bei älteren Menschen u. a. die charakteristischen Altersflecken auf der Haut hervorruft. Bei *C. elegans* ist das Vorkommen von Lipofuszin auf die 20 Zellen des Darms beschränkt und stellt in

diesem Organismus einen etablierten Marker für den Prozess des Alterns dar, da es im Laufe des Lebens akkumuliert und aufgrund seiner Autofluoreszenz leicht quantitativ erfasst werden kann [90-92]. Aufgrund der häufig diskutierten antioxidativen Kapazität von Flavonoiden und ihrer möglichen Eingriffe in den Prozess des Alterns ist ein Einfluss auf die Bildungsrate von Lipofuszin denkbar. Daher wurde auch die Lipofuszin-Akkumulation im Zuge der Charakterisierung der Wirkweise dieser Pflanzeninhaltsstoffe untersucht.

3.1.3.6 Subzelluläre Lokalisation des FoxO-Transkriptionsfaktors DAF-16

Der *C. elegans* FoxO Transkriptionsfaktor DAF-16 stellt einen Endpunkt diverser konservierter Signalwege dar und steuert als transkriptioneller Regulator wichtige physiologische Prozesse (Abb. 3.2). Die Aktivität des Rezeptors DAF-2 (Insulin-/IGF-I-Rezeptor; *insulin-like growth factor-I*) und des nachfolgenden Signalweges determiniert die subzelluläre Lokalisation von DAF-16 und dadurch seine transkriptionsaktivierende Funktion. Nach Ligandenbindung an DAF-2 wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors und zu seinem Ausschluss aus dem Zellkern führt. Bei Abwesenheit des Liganden (oder Mutationen in den entsprechenden Genen) unterbleibt die Phosphorylierung von DAF-16, wodurch der Transkriptionsfaktor in den Kern transloziert und dort die Transkription von Zielgenen initiiert.

Über diesen Signalweg wird zu einem bestimmten Zeitpunkt die Entscheidung getroffen, ob die normale Larvalentwicklung fortschreitet oder unter schlechten Umweltbedingungen ein alternativer Entwicklungsweg eingeschlagen wird, der zur Ausbildung eines Dauerstadiums führt. In späteren Phasen der Entwicklung und im adulten Tier ist diese Signalkaskade an der Kontrolle der Reaktion auf verschiedene Stressbedingungen und der Regulation der Lebensspanne beteiligt [93]. Auch ein Mitglied der Sirtuin-Familie von NAD⁺-abhängigen Protein-Deacetylasen, SIR-2.1, ist über noch nicht vollständig verstandene Mechanismen an der Kontrolle der Aktivität von DAF-16 beteiligt [94, 95]. Im Gegensatz zur Situation bei der Insulin/IGF-I Kaskade bewirkt eine Phosphorylierung von DAF-16 durch JNK-1 (c-Jun N-terminale Kinase), eine durch Umweltstress aktivierte MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*), die Translokation des Transkriptions-faktors in den Zellkern und eine Aktivierung [96]. Weiterhin kann DAF-16 auch den Nährstoff-Metabolismus beeinflussen, indem es mit dem mTOR/RAPTOR-Signalweg (*mammalian target of rapamycin, regulatory associated protein of mTOR*) interagiert [97].

Die zentrale Stellung, die DAF-16 bei *C. elegans* innerhalb dieser zahlreichen Regulationsmechanismen einnimmt, machte es zum einem vielversprechenden Gegenstand der Untersuchung von Flavonoid-Wirkungen auf der Ebene der Signaltransduktion. Mit dem transgenen Stamm TJ356, der ein Fusionsprotein aus DAF-16 und GFP als Reporter exprimiert [98], kann die subzelluläre Verteilung

dieses Transkriptionsfaktors einfach bestimmt werden und so der Einfluss der Flavonoide hierauf beobachtet werden.

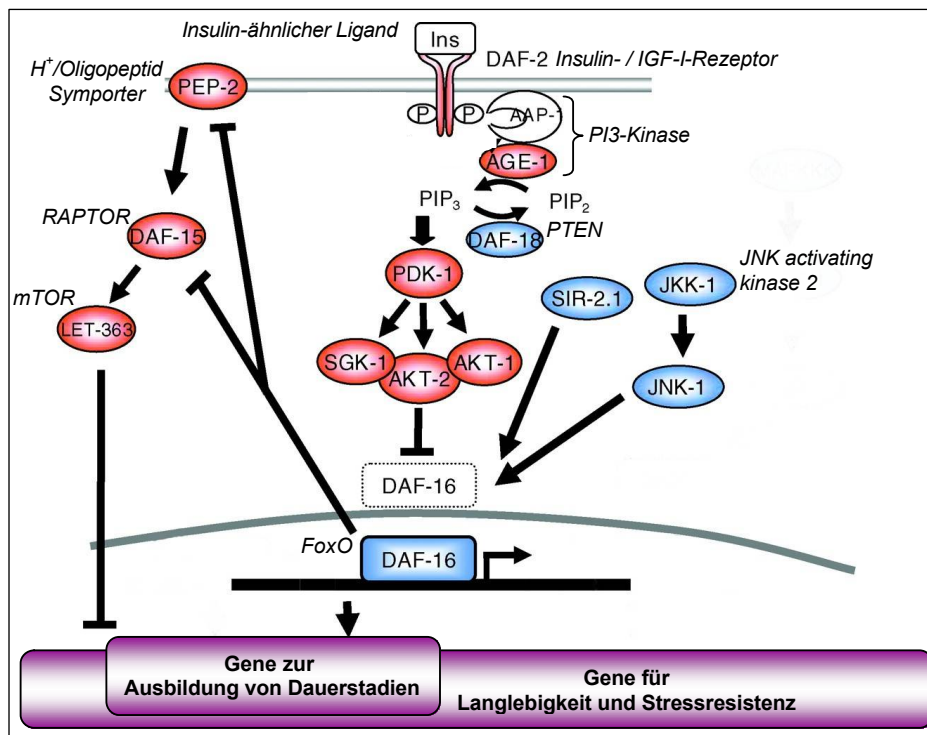


Abbildung 3.2:

Die Beteiligung des *C. elegans* FoxO-Transkriptionsfaktor DAF-16 an verschiedenen Signalwegen. Gene, deren Funktionsverlust zu einer Zunahme der Stress-Resistenz und einer Verlängerung der Lebensspanne führt, sind in Rot dargestellt, während bei den in Blau dargestellten Genen ein Funktionsverlust den gegenteiligen Effekt bewirkt. Bei Unterschieden in der Nomenklatur zwischen *C. elegans* und Säugern sind die Namen der Säuger-Homologe bzw. eine funktionelle Beschreibung angegeben. AAP-1: *phosphoinositide kinase adapter subunit-1*, AGE-1: *ageing alteration-1*, AKT-1/2=PKB: *Protein Kinase B*, DAF-x: *abnormal dauer formation-x*, FoxO: *forkhead box, subgroup O*, IGF-I: *insulin-like-growth factor-I*, Ins: *Insulin*, JKK-1: *JNK Kinase-1*, JNK-1: *Jun N-terminale Kinase-1*, LET-363: *lethal-363*, mTOR: *mammalian target of rapamycin*, PDK-1: *phosphoinositol-dependent kinase-1*, PEP-2=OPT-2: *oligopeptide transporter-2*, PI3-Kinase: *Phosphatidylinositol-3-Kinase*, PIP₂: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat*, PIP₃: *Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphat*, PTEN: *phosphatase and tensin homolog*, RAPTOR: *regulatory associated protein of mTOR*, SGK-1: *serum- and glucocorticoid- inducible kinase homolog-1*, SIR-2.1: *silent mating type information regulation-2.1* (modifiziert nach [93]).

In einer Studie wurde der Einfluss von Hungerbedingungen und Cu²⁺-Exposition auf die Verteilung von FoxO-Transkriptionsfaktoren vergleichend in kultivierten humanen Hepatomazellen (HepG2) und *C. elegans* untersucht (Publikation 8). In den HepG2-Zellen, die ein FoxO1a-EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) überexprimierten, und transgenen Würmern des Stamms TJ356 resultierten Hungerbedingungen – bei den Zellen Kultivierung in Serum-freiem Medium und bei den Würmern der Entzug von als Nahrungsquelle dienenden Bakterien – in einer gleichmäßigen Verteilung der FoxO-Transkriptionsfaktoren zwischen Zytosol und

Zellkern. Nach Aufhebung der Hungerbedingungen durch Zugabe von Insulin befand sich bei fast 90% der Zellen das Fusionsprotein im Zytosol und auch bei den Würmern wurde bei Anwesenheit einer ausreichenden Menge von Bakterien fast ausschließlich eine zytosolische Lokalisation beobachtet. Eine Behandlung der Zellen mit Cu^{2+} hatte den gleichen Effekt wie die Insulin-Gabe, so dass für Cu^{2+} eine Insulin-mimetische Wirkung postuliert wurde. In den Würmern wurde diese Wirkung bestätigt. Auch hier war im Anschluss an eine Cu^{2+} -Inkubation der Prozentsatz von Würmern mit einer cytosolischen Lokalisation von DAF-16 drastisch erhöht.

Demnach konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die FoxO-Transkriptionsfaktoren FoxO1a und DAF-16 identisch auf Hungerbedingungen und Cu^{2+} -Exposition reagieren. Das lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass auch die vorgeschalteten Signalvorgänge in gleicher oder zumindestens sehr ähnlicher Art beeinflusst wurden. Dies unterstreicht die allgemein anerkannte Aussage, dass der Insulin/IGF-I-Signalweg strukturell und funktionell sehr konserviert ist (*Publikation 5*), [24, 93, 99]. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse bezüglich der Wirkung von Flavonoiden auf diesen Signalweg von *C. elegans* auf Säuger bzw. den Menschen ist daher mit einiger Wahrscheinlichkeit gegeben.

3.2 Untersuchung der Wirkungen ausgewählter Flavonoide

3.2.1 Wirkung von Quercetin in kultivierten Ratten-Hepatomazellen und in *C. elegans*

Das Flavonol Quercetin ist in vielen pflanzlichen Lebensmitteln enthalten und stellt vermutlich mengenmäßig das für die menschliche Ernährung wichtigste Polyphenol dar [100]. Da dieses Flavonol darüber hinaus auch als Leitstruktur für die Substanzklasse der Flavonoide betrachtet wird, werden die Eigenschaften und Wirkungen des Quercetins ausführlich dargestellt. Die Ergebnisse zu den anderen untersuchten Flavonoiden werden in den folgenden Abschnitten dann hierzu in Bezug gesetzt und vergleichend bewertet.

3.2.1.1 Aufnahme und Metabolismus

Für das Verständnis der Wirkweise von Flavonoiden ist es wichtig zu wissen, ob die Substanzen über passive oder aktive Transportmechanismen in das Zellinnere gelangen oder ob sie ihre Wirkung über die Zellmembran hinweg ausüben, z. B. über Rezeptor-vermittelte Prozesse.

Das Flavonoid Quercetin wurde von kultivierten Ratten-Hepatoma-Zellen (H4IIE) effizient und schnell aufgenommen (*Publikation 10*). Die in den Zellen über HPLC-Analysen nachgewiesene Menge stieg dabei mit der Konzentration des Flavonoids im Kulturmedium an, ohne dass die Aufnahme im untersuchten Konzentrationsbereich (50 – 750 μM) einer Sättigung unterlag. Die in den Zellen gemessene Quercetin-Konzentration erreichte bereits nach einer Stunde Inkubation ihren Maximalwert von etwa 30 nmol/ 10^6 Zellen und nahm anschließend trotz fortlaufender Inkubation stetig ab, so dass nach acht Stunden nur noch etwa 10% der Maximalkonzentration gemessen wurde. Dies lässt auf einen raschen metabolischen Abbau oder Export dieser Substanz schließen. Mittels HPLC-MS-MS Analysen wurden drei Glucuronsäuremetaboliten als Abbauprodukte des Quercetin identifiziert, die besser wasserlöslich sind als die Ursprungssubstanz und daher möglicherweise leichter aus der Zelle heraustransportiert werden können. Da in diesen Analysen keine anderen Metaboliten wie z. B. Sulfat- oder Methylverbindungen gefunden wurden, wird davon ausgegangen, dass in H4IIE-Zellen der Metabolismus primär über die Kopplung an Glucuronsäure erfolgt.

Die Aufnahme in die Zellen konnte auch durch fluoreszenz-mikroskopische Beobachtungen bestätigt werden. Hierbei wurde das Flavonoid überwiegend im Bereich des Zellkerns lokalisiert, so dass eine intrazelluläre Inaktivierung des Quercetins durch Einlagerung in Speichervesikel ausgeschlossen werden konnte.

Auch in *C. elegans* wurde über HPLC-Analysen die Aufnahme des Quercetins nachgewiesen (*Publikation 1*). Jedoch erfolgt die Aufnahme offensichtlich deutlich langsamer als in den H4IIE-Zellen, da das Quercetin erst nach 20-stündiger Inkubation (100 μM) in den Würmern detektiert werden konnte. Diese Diskrepanz kann durch den prinzipiellen Unterschied der beiden Testsysteme bedingt sein: Die kultivierten Zellen wachsen an den Boden des Kulturgefäßes angeheftet in einer einlagigen Schicht und sind alle gleichmäßig gegenüber dem Flavonoid exponiert, das nur jeweils eine Membran überqueren muss, um in die Zellen zu gelangen. Bei *C. elegans* als mehrschichtigem Organismus mit einer komplexen zellulären Struktur ist eine solche gleichmäßige Exposition der Zellen nicht gegeben. Nur die Zellen an den Grenzflächen zum Inkubationsmedium – also die Oberfläche und der Darm – sind in Kontakt zum Inkubationsmedium, wobei die von einer Kutikula überzogenen epithelialen Zellen auch nicht direkt gegen das Quercetin exponiert sind. Es ist jedoch auch möglich, dass der Unterschied in der Aufnahmekinetik durch aktive Prozesse bedingt ist. Im Säuger werden bestimmte Transportproteine wie z. B. der Na^+ -Glukose-Kotransporter SGLT1 und der Glukosetransporter GLUT2 im Zusammenhang mit der spezifischen Resorption von Flavonoiden diskutiert [101-104], während in *C. elegans* nichts über den Aufnahmemechanismus von Flavonoiden bekannt ist. Eine Abschätzung der intrazellulären Quercetin-Menge ergab eine Konzentration von 0,04 – 0,12 nmol/1000 Würmer, wenn eine gleichmäßige Verteilung des Flavonoids in allen Zellen des Wurms vorausgesetzt wird (*Publikation 1*). Da ein hermaphroditischer Wurm aus exakt 959 somatischen Zellen besteht, ist dieser Wert um das 250 – 750-fache niedriger als in H4IIE-Zellen (~ 30 nmol/ 10^6 Zellen). Bei der

wahrscheinlicheren Annahme, dass das Quercetin vorwiegend in den 20 Darmzellen des Wurms lokalisiert ist, berechnet sich jedoch mit 2,0 – 7,2 nmol Quercetin pro 10^6 intestinale Zellen eine Konzentration, die in einem ähnlichen Größenbereich liegt wie die Quercetin-Konzentration in den Ratten-Hepatomazellen.

In *C. elegans* konnten bisher keine Metabolite des Quercetins detektiert werden. Auch hierfür können verschiedene Erklärungsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden: Es ist bekannt, dass *C. elegans* alle Klassen an Enzymen der Phase I und Phase II besitzt, allerdings weiss man relativ wenig über den Metabolismus in diesem Organismus, besonders in Bezug auf Xenobiotika [105, 106]. Es existiert eine Vielzahl an UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT-1 bis -65; <http://www.wormbase.org>) in *C. elegans*, so dass es durchaus möglich, dass eines dieser Enzyme Quercetin als Substrat erkennt und die Kopplung von Glucuronsäure daran katalysieren kann. Möglicherweise ist die fehlende Detektion von Metaboliten aber auch auf eine zu geringe Sensitivität der Analyse zurückzuführen. Im Vergleich zu den H4IIE-Zellen ist der Aufschluss der Würmer experimentell wesentlich schwieriger und es bedarf mehrerer Schritte, um die Würmer und letztendlich ihre Zellen zu lysieren, bevor die Extrakte analysiert werden können.

3.2.1.2 Antioxidative Eigenschaften

Radikalfänger-Aktivität

Einige Flavonoide können mit Radikalen reagieren und Elektronen bzw. Wasserstoffatome auf diese Verbindungen übertragen, die dadurch ihren radikalischen Charakter verlieren. Die Fähigkeit der Flavonoide (und anderer Substanzen), auf solche Weise Radikale abzubauen, wird als Radikalfänger-Aktivität bezeichnet und kann einen Grund für die protektiven Effekte von bestimmten Flavonoiden darstellen. In einem zellfreien Ansatz (TEAC-Assay), bei dem ein Radikal unter Veränderung der Farbigkeit des Gemisches durch die Testsubstanz reduziert werden kann, zeigte Quercetin eine hohe Radikalfänger-Aktivität und somit eine direkte antioxidative Wirkung, die sogar die Wirkung der Referenzsubstanz Trolox (synthetisches Vitamin E Derivat) überstieg (*Publikationen 1 und 10*).

ROS-Akkumulation und oxidativer Stress

ROS entstehen in jeder aeroben Zelle sowohl durch endogene Prozesse als auch durch exogene Einflüsse (vgl. 3.1). Die Zellen sind dieser Situation gegenüber jedoch angepasst und über antioxidative Systeme stellt sich im Normalfall eine Redox-Homeostase ein. Kann dieses Gleichgewicht nicht aufrecht erhalten werden, weil die anfallende ROS-Menge von den antioxidativen Systemen nicht kompensiert werden kann, entsteht oxidativer Stress und in Folge eine oxidative Schädigung von zellulären Komponenten.

Durch die Behandlung von *C. elegans* mit 100 μM Quercetin für 48 Stunden wurde im DCF-Assay (vgl. 3.1.3.2) bei thermalem Stress (37°C) eine Verringerung bzw. eine zeitliche Verzögerung der ROS-Akkumulation in lebenden Würmern im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (*Publikation 3*). Die Anwendung von thermalem Stress war notwendig, um über die dadurch hervorgerufene Steigerung der ROS-Bildung bzw. der gemessenen Fluoreszenzintensität in den einzelnen Würmern den Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen zuverlässig darstellen zu können.

Die GST-4 wird durch intrazellulären oxidativen Stress stark heraufreguliert, vermutlich weil in dieser Situation oxidative Reaktionsprodukte entstehen, die Substrate des Enzyms darstellen (z. B. Hydroperoxide und trans-2-Nonenal) und seine Expression induzieren (*Publikation 12*). Die Expression des GST-4::GFP Reporterproteins im Stamm BL1 kann dementsprechend als Marker für oxidativen Stress verwendet werden, indem die Fluoreszenz in lebenden Würmern densitometrisch bestimmt wird (vgl. 3.1.3.3).

Eine Quercetin-Behandlung (100 μM für 48 Stunden) reduzierte die Induktion der Reporter-Expression, die durch einen moderaten intrazellulären oxidativen Stress ausgelöst wurde (20 μM Juglone für 24 Stunden in Anwesenheit von Quercetin), um ca. 50% (*Publikation 3*). Wie oben begründet, demonstriert dieses Ergebnis, dass Quercetin in *C. elegans* intrazellulären oxidativen Stress bzw. oxidative Schädigungen verringert.

Diese antioxidative Wirkung des Quercetin konnte auch durch die Beobachtung der durch das „Alterspigment“ Lipofuszin hervorgerufenen Autofluoreszenz im Darm von *C. elegans* bestätigt werden. Lipofuszin akkumuliert in fortschreitender Weise in alternden Geweben als Ergebnis der oxidativen Degradation und Autophagozytose von zellulären Komponenten. Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens in zahlreichen Organismen wird es als ein universeller Marker für das Altern betrachtet (vgl. 3.1.3.5) [90].

Die nach Quercetin-Behandlung (100 μM für 72 Stunden) im Vergleich zur Kontrolle festgestellte Abnahme der Lipofuszin-Autofluoreszenz um mehr als 40% (*Publikation 3*) wurde als eine Konsequenz der verminderten oxidativen Degeneration von Zellbestandteilen und damit als weiterer Beleg für die antioxidative Kapazität dieses Flavonoids interpretiert.

3.2.1.3 Protektive Eigenschaften

Im vorigen Abschnitt wurde die antioxidative Aktivität des Quercetins im zellfreien System und im *in vivo* Modell *C. elegans* dargestellt. Nun werden die Untersuchungen beschrieben, mit denen überprüft wurde, ob die antioxidative Wirkung

auch eine schützende Wirkung für die kultivierten Zellen und *C. elegans* unter Stressbedingungen zur Folge hatte.

Schutz vor Stressbedingungen

Zur experimentellen Erzeugung von oxidativem Stress im Zellkultursystem wurde H₂O₂ verwendet, das mit einem EC₅₀-Wert von 85 µM relativ cytotoxisch auf die H4IIE-Zellen wirkte und zu einem starkem Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration führte (*Publikationen 9 und 10*). Das Absterben der Zellen erfolgte dabei wahrscheinlich über den Prozess der Apoptose, da eine Aktivierung der zentralen Effektor-Caspase 3 als Apoptose-Marker beobachtet wurde (*Publikation 10*). H₂O₂ verursachte in Abhängigkeit von seiner Konzentration (bis 500 µM) auch eine starke Zunahme der DNA-Strangbrüche (*Publikation 9*).

Durch die Inkubation der H4IIE-Zellen mit 10-25 µM Quercetin für eine Stunde vor der Anwendung des oxidativen Stresses wurden deutlich protektive Wirkungen gegen die schädlichen Effekte des H₂O₂ erzielt (*Publikation 10*): Die Viabilität der Zellen stieg durch die Vorbehandlung mit 10 µM Quercetin um ca. 50%, die H₂O₂-induzierte Aktivität der Caspase 3 wurde durch 25 µM Quercetin um mehr als 50% verringert und die Länge der „Kometenschweife“ in der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay) als Indikator für DNA-Strangbrüche nahm durch 10 µM Quercetin um etwa 50% ab.

Mit H₂O₂ konnten in *C. elegans* bei der Generierung von oxidativem Stress keine reproduzierbaren Ergebnisse produziert werden, so dass das Semichinon Juglone zu diesem Zweck verwendet wurde (vgl. 3.1.1). Die eingesetzten Konzentrationen von Juglone (150 oder 230 µM) bewirkten ein Absterben der Würmer innerhalb einiger Stunden (*Publikationen 1, 11 und 12*). Als ein weiterer Stressor wurde Hitze verwendet, indem die Würmer bei der für sie akut letalen Temperatur von 37°C gehalten wurden (vgl. 3.1.3.1). Dieser thermale Stress erhöhte stark die intrazelluläre ROS-Menge und verkürzte die (Über-)Lebensspanne der Würmer ebenfalls auf wenige Stunden (*Publikationen 2-4*).

Auch bei *C. elegans* vermittelte die Inkubation mit 100 µM Quercetin für 72 bzw. 48 Stunden eine deutliche Protektion gegen den oxidativen und thermalen Stress (*Publikationen 1 und 3*). Die mittlere Überlebenszeit der Würmer stieg durch die Behandlung bei oxidativem Stress um ca. 20% (von 15,8 auf 18,9 Stunden) und bei thermalem Stress um etwa 12% (von 4,55 auf 5,10 Stunden).

Einfluss auf die Lebensspanne bei C. elegans

Sowohl die Steigerung der Resistenz gegen verschiedene Stressoren als auch die Verringerung des „Alterspigments“ Lipofuszin (vgl. 3.2.1.5) deuteten daraufhin, dass Quercetin auch einen Effekt auf den Prozess des Alterns bei *C. elegans* haben könnte. Bei permanenter Anwesenheit von Quercetin (100 µM) unter ansonsten normalen Kulturbedingungen wurde die mittlere und mediane Lebensspanne der

Würmer im Vergleich zur Kontrolle um 15% (von 21,1 auf 24,3 Tage) bzw. 19% (21,0 auf 25,0 Tage) verlängert (*Publikation 1*). Die maximale Lebenserwartung der Tiere erhöhte sich in den durchgeführten Experimenten um mehr als 5 Tage bzw. um ungefähr 15% (von 35,4 auf 40,7 Tage).

3.2.1.4 Adverse Eigenschaften

Die radikalfangende und damit antioxidative Eigenschaft vieler Flavonoide basiert auf der Abgabe von Wasserstoffatomen. Bei dieser Reaktion wird das Flavonoid zu einem Flavonoidradikal oxidiert, das unter Verbrauch von zellulären Redox-äquivalenten wieder zum Ausgangsmolekül regeneriert werden kann. Dies ist jedoch nur so lange möglich, wie ausreichend Redoxäquivalente zur Regeneration zur Verfügung stehen. Bei ausreichend hoher Konzentration an Flavonoid werden die entstandenen Radikale unter Bildung von Superoxidanion-Radikalen weiter zu reaktiven Chinonen oxidiert. Beide entstehenden Produkte können mit zellulären Bestandteilen reagieren und sie schädigen.

Quercetin zeigte in einem Konzentrationsbereich (MTT-Test: 35 μM ; Neutralrot-Test: 135 μM) zytotoxische Wirkung auf H4IIE-Zellen, der nahe an dem Bereich lag, für den zuvor schützende Effekte beschrieben wurde (*Publikation 10*). Allerdings war diese Zytotoxizität nicht mit einem gesteigerten oxidativen Stress assoziiert, da selbst nach Inkubation der Zellen mit 500 μM Quercetin keine Zunahme der Malondialdehyd-Freisetzung als Indikator der Lipidperoxidation festgestellt wurde. Quercetin führte jedoch zur Induktion von DNA-Strangbrüchen, die im „Comet-Assay“ nachgewiesen wurden. Dabei erwies sich mit 50 μM bereits eine Konzentration als schädlich, die vor H_2O_2 -vermittelten Strangbrüchen schützte. Offensichtlich kann Quercetin in dieser Konzentration sowohl einen Schutz gegen massive DNA-Schädigungen vermitteln als auch bei Abwesenheit eines Stressors selbst (in moderaterer Weise) die DNA schädigen. Es ist vorstellbar, dass diese gegensätzlichen Wirkungen auf unterschiedlichen Effekten des Quercetins beruhen: Die antioxidative Eigenschaft kann zu einer Verminderung der oxidativen Schädigung der DNA (durch H_2O_2) führen, während spezifische Protein-Interaktionen, z. B. die Inhibition von Topoisomerasen [107], die Grundlage für die durch Quercetin ausgelösten DNA-Strangbrüche darstellen können.

Durch Quercetin wurde in H4IIE-Zellen auch der Prozess der Apoptose angeschaltet. Die Aktivität der Initiator-Caspasen 2 und 8 sowie die der Effektor-Caspase 3 wurde erhöht (ab 250 μM), eine DNA-Fragmentierung wurde nachgewiesen und der apoptotische Index stieg um den Faktor 18 (500 μM). Als Ursache für die Apoptose-Induktion kann die DNA-schädigende Wirkung des Quercetins in Betracht gezogen werden, wobei nach Erkennung der Schäden durch das ATM-Protein (*ataxia telangectasia mutated*) das Protein p53 aktiviert und über den mitochondrialen Signalweg die Apoptose-Kaskade einleitet wird. Es wird auch berichtet, dass

Quercetin den anti-apoptischen Akt/PKB-Signalweg hemmt, indem es mit der PI3-Kinase interagiert und deren Aktivität inhibiert [10]. In *C. elegans* bewirkt dieser Signalweg im aktiven Zustand den Ausschluss des FoxO-Transkriptionsfaktors DAF-16 aus dem Kern. Nach Quercetin-Behandlung war DAF-16 vermehrt nukleär lokalisiert (vgl. 3.2.1.5) – ein Effekt, der mit einer möglichen Hemmung der PI3-Kinase und der nachfolgenden Kaskade im Einklang steht. Weiterhin wird in der Literatur diskutiert, ob Flavonoide direkt an den Mitochondrien angreifen und die Cytochrom C Freisetzung beeinflussen oder dort pro-apoptische Faktoren wie z. B. Smac/DIABLO aktivieren [10].

In *C. elegans* wurden bei einer Konzentration von 100 µM keine adversen Effekte des Quercetins festgestellt. Allerdings war eine Steigerung der Konzentration darüber hinaus nicht möglich, weil höhere Mengen an Quercetin in dem flüssigen Kulturmedium ausfielen, so dass keine Aussage über die Wirkung von Quercetin auf diesen Organismus bei höheren Dosen getroffen werden kann.

3.2.1.5 Wirkungen auf molekularer Ebene in *C. elegans*

Die antioxidative Kapazität des Quercetins kann als eine Erklärung für die beschriebenen schützenden und lebensverlängernden Einflüsse dieses Flavonoides dienen. In der Literatur wird jedoch zunehmend diskutiert, ob vorwiegend die antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide für die beobachteten Effekte verantwortlich sind oder ob stimulierende bzw. inhibitorische Interaktionen mit signalleitenden Molekülen die Hauptwirkungen dieser Substanzgruppe bedingen [10, 108]. So wurde gezeigt, dass Flavonoide u. a. mit der PI3-Kinase, mit der Proteinkinase B (PKB oder AKT), mit Tyrosin-Kinasen und MAP-Kinasen interagieren. Die Phosphorylierungs- und Aktivierungszustände dieser Signalproteine steuern über komplexe Netzwerke die zellulären Funktionen, so dass Eingriffe in dieses Regelwerk erhebliche Auswirkungen haben.

Die Veränderung der Expression von Genen könnte eine indirekte antioxidative Wirkung von Flavonoiden zur Folge haben, wenn antioxidative Gene hochreguliert werden. In vielen langlebigen und gleichzeitig stressresistenten Mutanten von *C. elegans* ist die SOD-3, das Homolog der mitochondriale Mangan-SOD in Säugern, hochreguliert. Da auch Quercetin eine Steigerung der Stressresistenz und eine Verlängerung der Lebensspanne bei *C. elegans* bewirkte, wurde der Einfluss des Flavonoids auf dieses Enzym mit Hilfe des SOD-3::GFP Reporters im transgenen Stamm CF1553 untersucht (vgl. 3.1.3.4). Wie erwartet wurde die Expression dieser stress-responsiven SOD-3 durch die Behandlung mit Juglone und durch Hitze verstärkt (*Publikation 1*). Unter normalen Kulturbedingung wurde nach Quercetin-Behandlung (100 µM für 72 Stunden) allerdings eine verringerte Expression beobachtet. Auch in H4IIE-Zellen wurde die Expression der MnSOD durch

Quercetin-Behandlung reduziert [109]. Möglicherweise wird die Redox-Situation in den Zellen durch die (direkte) antioxidative Wirkung von Quercetin so günstig beeinflusst, dass eine geringere Menge an SOD-3 ausreicht, um das Gleichgewicht aus ROS-Entstehung und -Abbau aufrechtzuerhalten. Die Reaktion der SOD-3 würde dann prinzipiell dem Verhalten der GST-4 entsprechen, die als Marker für oxidativen Stress betrachtet wurde und nach Quercetin- und EGb761-Behandlung ebenfalls in verminderter Menge exprimiert wurde (vgl. 3.1.3.3 und 3.2.1.2; *Publikationen 3 und 4*). Es allerdings nicht auszuschließen, dass der Rückgang der SOD-3 Expression auf wesentlich kompliziertere Mechanismen zurückzuführen ist, wie z. B. eine Änderung im mitochondrialen Metabolismus und eine damit verbundene Abnahme der Menge an entstehenden Superoxidanionradikalen.

Der *C. elegans* FoxO-Transkriptionsfaktor DAF-16 hat als Endpunkt zahlreicher Signalkaskaden eine zentrale Stellung bei den Prozessen zur Kontrolle der Reaktion auf Stressreize und bei der Regulation der Lebensspanne (vgl. 3.1.3.6). Die Lokalisation im Kern ist dabei eine essentielle (aber nicht ausreichende) Voraussetzung für die transkriptionsaktivierende Wirkung von DAF-16. Die Beobachtung der subzellulären Verteilung dieses Faktors erlaubt somit zum Einen Rückschlüsse auf die Aktivität der vorgeschalteten Signalwege und zum Anderen Hinweise auf seine potentielle Wirkung als Transkriptionsaktivator.

Thermaler (37°C für zwei Stunden) und oxidativer Stress (75 µM Juglone für 14 Stunden) bewirkten eine Translokation von DAF-16 in den Zellkern: 100% der beobachteten Würmer zeigten nur im Zellkern Fluoreszenz (*Publikation 1*). Auch die Behandlung mit Quercetin (100 µM für 72 Stunden) hatte eine Zunahme des Anteils an Würmern mit einer Kernlokalisierung des Reporterproteins um mehr als den Faktor drei zur Folge (von 4% auf 17% bzw. von 11% auf 37%; *Publikationen 1 und 3*).

Da Quercetin wie bereits beschrieben eine starke antioxidative Kapazität aufwies und die intrazelluläre Redox-Situation verbesserte, ist es wenig wahrscheinlich, dass die beobachtete Translokation von DAF-16 in den Kern eine Reaktion auf Stressbedingungen in den Zellen darstellt. Die Veränderung der subzellulären Verteilung ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Beeinflussung eines oder mehrerer Signalwegen durch das Flavonoid zurückzuführen. Diese Aktivität des Quercetin stellt offensichtlich eine zusätzliche Wirkkomponente zur antioxidativen Kapazität dar. Dabei kann momentan nicht abgeschätzt werden, welchen Anteil die beiden beschriebenen Wirkweisen jeweils an der Gesamtwirkung der Substanz haben.

3.2.2 Wirkung von Rutin in kultivierten Ratten-Hepatomazellen und in *C. elegans*

Rutin (Quercetin-3-Rutinosid) ist ein glykosidisches Flavonoid, das sich vom Quercetin nur durch das angefügte Disaccharid aus Rhamnose und Glucose

(Rutinose) unterscheidet. Dieser zusätzliche Zuckerrest hat für die Wirksamkeit des Flavonoids – besonders in kultivierten Zellen – entscheidende Bedeutung.

Das Rutin wurde im Gegensatz zum Quercetin von den Ratten-Hepatoma-Zellen H4IIE nicht aufgenommen (*Publikation 10*). Da sich Quercetin, das sehr gut von den Zellen aufgenommen wurde, und Rutin nur durch den Zuckerrest voneinander unterscheiden, muss dieser für das Ausbleiben der Aufnahme verantwortlich sein. Der Mechanismus, mit dem die H4IIE-Zellen das Quercetin aufnehmen, ist bisher nicht aufgeklärt. Daher ist auch unklar, wie die Zuckergruppe die Aufnahme unterbindet. Es kann spekuliert werden, dass der Zuckerbaustein die Diffusion über die Zellmembran erschwert bzw. verhindert, da Rutin durch diese Struktur im Vergleich zum Quercetin deutlich hydrophiler wird und durch die räumliche Ausdehnung auch eine sterische Hinderung am Durchtritt durch die Membran bestehen könnte. Bei aktiven Transportsystemen ist möglicherweise die notwendige spezifische Erkennung bzw. die Anlagerung an entsprechende Domänen durch die zusätzliche Struktur gestört.

Flavonoide liegen in pflanzlichen Lebensmitteln überwiegend in glykosidischer Form vor. In Abhängigkeit von der Struktur des glykosidischen Restes und der Position der Verknüpfung am Flavonoidgerüst erfolgt eine hydrolytische Abspaltung durch intestinale humane oder bakterielle Enzyme, so dass anschließend die Flavonoide als Aglykone der Resorption zugänglich sind [110]. Das Disaccharid des Rutin wird im Dickdarm durch die dortige Mikroflora hydrolytisch abgespalten und das entstehende Quercetin wird absorbiert [111].

In den isolierten Ratten-Hepatoma-Zellen ist eine solche Spaltungsreaktion nicht möglich, so dass die fehlende zelluläre Resorption zu einer biologischen Inaktivität des Rutins bezüglich sowohl protektiver als auch adverser Effekte in diesem Zelltyp führt (*Publikation 10*).

Bei *C. elegans* wurde bisher auch keine zelluläre Aufnahme des Rutins nachgewiesen. Im Gegensatz zur Arbeit mit kultivierten Zellen ist die Vorgehensweise, die Aufnahme einer Substanz mittels HPLC-Analytik nachzuweisen, bei diesem Organismus neuartig und in der Literatur bisher nicht beschrieben. Da sich die Methodik noch in der Etablierungsphase befindet und auf keine Erfahrungswerte zurückgegriffen werden konnte, bedeutet die fehlende Detektion nicht zwangsläufig, dass Rutin nicht von den Würmern aufgenommen wurde.

Die weiter unten beschriebenen biologischen Wirkungen dieses Flavonoids lassen eine Aufnahme von Rutin (oder einem Spaltprodukt) sogar wahrscheinlich erscheinen. Die intestinalen Aufnahme- und Verdauungsprozesse sind bei *C. elegans* bisher weitgehend unerforscht. Im menschlichen Darm werden Flavonoid-Glykoside mit einem Rhamnose-Bestandteil weniger schnell und effizient aufgenommen als aglykosidische Verbindungen und Glucoside. Überträgt man dieses Szenario auf die Situation bei *C. elegans* unter der Annahme, dass die Würmer zur Abspaltung des Disaccharids fähig sind, so sind nach Behandlung mit

Rutin nur vergleichsweise geringe intrazelluläre Mengen an Quercetin als aglykosidisches Spaltprodukt zu erwarten. Es ist jedoch auch möglich, dass Rutin von *C. elegans* über (unbekannte) unspezifische oder spezifische Wege mit geringer Effizienz resorbiert wird. In beiden Fällen könnte die Sensitivität der HPLC-Analysen nicht ausreichend gewesen sein, um die geringen Mengen an aufgenommenem Rutin oder durch Spaltung entstandenen Quercetins zu detektieren.

Im zellfreien System war die Radikalfänger-Aktivität des Rutins zwar schwächer als die des Quercetins, aber im gleichen Bereich wie die Aktivität der Referenzsubstanz Trolox (*Publikation 10*). Trolox hat als synthetisches Vitamin E Analogon eine hohe antioxidative Kapazität, so dass auch Rutin ein gutes Antioxidans darstellt. Mit dieser Eigenschaft wäre die Verringerung der intrazellulären ROS-Menge zu erklären, die in den Würmern unter thermalem Stress (37°C) beobachtet wurde (*Publikation 3*). Im Einklang mit der im Vergleich zum Quercetin geringeren Radikalfänger-Aktivität im zellfreien System bewirkte Rutin hierbei ebenfalls eine etwas schwächere Reduktion der ROS-Akkumulation als Quercetin. Auch intrazellulärer oxidativer Stress – induziert durch Juglone und gemessen mit Hilfe des GST-4::GFP Reporters – wurde durch Rutin herabgesetzt, aber in einem schwächeren Ausmaß als dies mit Quercetin der Fall war.

Rutin vermittelte genau wie Quercetin einen Schutz gegen einen induzierten oxidativen Stress (150 µM Juglone) und verlängerte die mittlere Überlebensspanne um 19% von 15,8 Stunden (Kontrolle) auf 18,8 Stunden (nicht veröffentlicht). Ansonsten wurden keine weiteren protektiven Wirkungen des Rutins in *C. elegans* festgestellt. Es wurde weder die Thermoresistenz beeinflusst (*Publikation 3*) noch die Lebensspanne der Würmer verändert. Die Rutin-Behandlung hatte auch keinen Einfluss auf die Lipofuszin-Menge und somit erwies sich die Akkumulation dieses „Alterspigments“ wie auch beim Quercetin als ein guter Indikator für die Wirkung einer Substanz auf die Lebensspanne. Die subzelluläre Lokalisation des FoxO-Proteins DAF-16 wurde durch Rutin nicht signifikant beeinflusst, es war jedoch eine graduelle Verschiebung dieses Transkriptionsfaktors in Richtung Zellkern zu beobachten. Auch wurde die Expression des antioxidativen Enzyms SOD-3, des Homologs zur mitochondrialen MnSOD, durch Rutin herabreguliert.

Zusammengefasst führen die Ergebnisse zu der Vermutung, dass Rutin (oder ein Spaltprodukt) in *C. elegans* nur eine geringe Bioverfügbarkeit aufweist und daher intrazellulär in Konzentrationen vorliegt, die zwar bestimmte antioxidative Wirkungen und eine Steigerung der Resistenz gegen oxidativen Stress hervorrufen können, aber für eine Beeinflussung der Thermoresistenz, der Lebensspanne und der Lokalisation von DAF-16 sowie für einen Nachweis in der HPLC-Analytik nicht ausreichend hoch sind.

3.2.3 Wirkung von Kaempferol und Fisetin in kultivierten Ratten-Hepatomazellen und in *C. elegans*

Die Flavonole Kaempferol und Fisetin, die ebenfalls in vielen pflanzlichen Nahrungsmitteln enthalten sind, unterscheiden sich vom Quercetin nur durch die Abwesenheit jeweils einer Hydroxylgruppe. Im Vergleich zum Quercetin fehlt dem Kaempferol die OH-Gruppe an Position 5' des B-Rings und dem Fisetin an Position 5 des A-Rings.

3.2.3.1 Aufnahme und Metabolismus

Beide Flavonoide werden, genau wie das Quercetin, schnell in H4IIE-Zellen aufgenommen – die höchsten intrazellulären Mengen wurden jeweils nach 60 Minuten nachgewiesen (*Publikationen 9 und 10*). Die erreichten Flavonoid-Konzentrationen waren dabei etwas geringer als die des Quercetins, wobei Fisetin

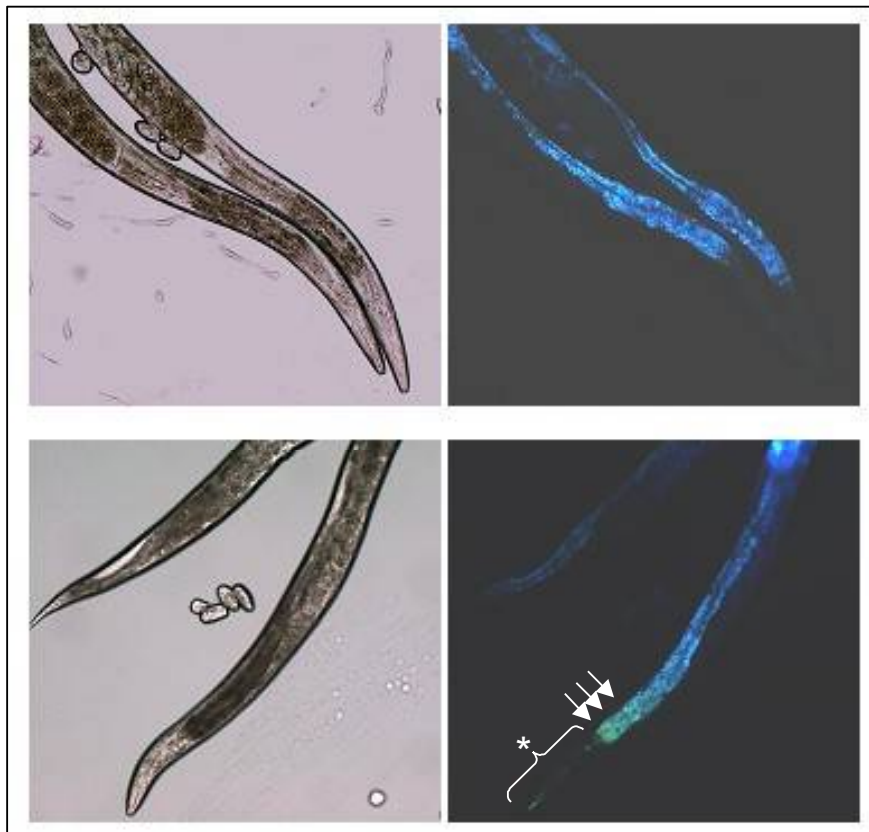


Abbildung 3.3:

UV-mikroskopischer Nachweis der Aufnahme von Fisetin in *C. elegans*. Abgebildet sind repräsentative lichtmikroskopische (links) und UV-mikroskopische (rechts) Aufnahmen von adulten *C. elegans* Würmern, die für 24 Stunden in 100 μM Fisetin (unten) oder Kontrollmedium inkubiert wurden. Im Bereich des Pharynx (*) und des vorderen Darmbereich (\downarrow) ist bei dem behandelten Wurm eine grüne Fluoreszenz sichtbar, die bei den Kontrollwürmern nicht vorkommt und durch das aufgenommene Fisetin bedingt ist. Die blaue Fluoreszenz wird durch das Lipofuszin hervorgerufen.

noch etwas besser aufgenommen wurde als das Kaempferol. Genau wie bei Quercetin konnte auch für Kaempferol die Aufnahme in die Zellen UV-mikroskopisch bestätigt werden (*Publikation 9*). Kaempferol ist jedoch im Gegensatz zum Quercetin nicht vorwiegend im Kern lokalisiert.

Es wurden zwei Kaempferol-Glucuronide als Metabolite identifiziert (*Publikation 9*), so dass der Abbau des Kaempferols wahrscheinlich über die gleichen oder sehr ähnliche Wege verläuft wie der des Quercetins.

Erste Ergebnisse aus HPLC-Analysen zur Aufnahme von Kaempferol und Fisetin in *C. elegans* weisen darauf hin, dass diese beiden Flavonole nach Inkubation für 20 Stunden auch in den Zellen des Wurms vorliegen (unveröffentlicht). Genau wie bei Quercetin konnten jedoch bisher noch keine Metabolite detektiert und identifiziert werden, da – wie schon beschrieben – die Methodik neuartig und die Sensitivität noch nicht ausreichend ist.

Für Fisetin, das die intensivste Eigenfluoreszenz der untersuchten Flavonoide aufweist, wurde die Aufnahme in *C. elegans* UV-mikroskopisch nachgewiesen (*Abb. 3.3*, unveröffentlicht).

3.2.3.2 Antioxidative Eigenschaften

Radikalfänger-Aktivität

Kaempferol und Fisetin erwiesen sich beide im zellfreien System (TEAC-Assay) als gute Antioxidantien, wobei die Radikalfänger-Aktivität des Fisetins noch deutlich höher als die des Kaempferols und mit der Aktivität des Quercetins vergleichbar war. Kaempferol zeigte eine ähnliche antioxidative Kapazität wie die Referenzsubstanz Trolox und lag damit auf dem gleichen Niveau wie Rutin (*Publikationen 9 und 10*).

ROS-Akkumulation und oxidativer Stress

In H4IIE-Zellen wurde die antioxidative Kapazität des Kaempferols bestätigt. Eine Vorinkubation der Zellen verringerte die H₂O₂-induzierte ROS-Akkumulation in zeit- und dosisabhängiger Weise (*Publikation 9*). Auch die freigesetzte MDA-Konzentration wurde nach H₂O₂-induzierter Lipidperoxidation durch Kaempferol herabgesetzt und erreichte annähernd den Wert der Kontrolle (ohne H₂O₂-Behandlung).

Genau wie in den H4IIE-Zellen wurde auch in *C. elegans* die ROS-Akkumulation, die durch thermalen Stress ausgelöst wurde, durch Kaempferol verringert. Dabei war das Kaempferol in etwa so antioxidativ wirksam wie das Quercetin. Obwohl Fisetin im zellfreien System im Vergleich zum Kaempferol die höhere Radikalfänger-Aktivität aufwies, zeigte es bei der Reduktion gegen die thermal induzierte ROS-Akkumulation einen schwächeren Effekt (*Publikation 2*).

Auch der durch den Redox-Cycler Juglone ausgelöste intrazelluläre oxidative Stress wurde durch beide Flavonoide verringert. Kaempferol hatte erneut einen stärkeren Einfluss auf diesen Endpunkt als das Fisetin und bewirkte eine ungefähr gleich starke Verminderung der Expression des GST-4::GFP Reporters wie Quercetin, während der Effekt des Fisetins sogar noch etwas schwächer war als der des Rutins (*Publikation 2*).

Die Anhäufung des Lipofuszens wurde durch die Behandlung der Würmer mit Kaempferol deutlich verzögert, ohne dass das Maß der Verringerung erreicht wurde, das mit Quercetin erzielt wurde. Fisetin reduzierte die Lipofuszin-Menge ebenfalls, allerdings waren die festgestellten Unterschiede zur Kontroll-Population statistisch nicht signifikant (*Publikation 2*).

Die anhand des Modells *C. elegans* erhaltenen Daten zur antioxidativen Wirkung von Flavonoiden *in vivo* korrelieren nur bedingt mit der Radikalfänger-Aktivität der einzelnen Flavonoide im zellfreien System. Der starke Radikalfänger Quercetin war auch in den Würmern antioxidativ wirksam und zeigte die stärksten Effekte der untersuchten Flavonoide auf die beobachteten Endpunkte. Der ebenso gute Radikalfänger Fisetin hatte *in vivo* nur verhältnismäßig schwache (ROS-Akkumulation, oxidativer Stress) bzw. keine antioxidative Wirkung (Lipofuszin-Akkumulation). Seine Wirkung in den Würmern war vergleichbar mit der Wirkung des glykosylierten Quercetin-Derivats Rutin, das jedoch im zellfreien Ansatz eine deutlich geringere Tendenz zum Abfangen von freien Radikalen aufwies. Kaempferol hingegen, dessen Radikalfänger-Aktivität ebenfalls auf dem Niveau der Referenzsubstanz Trolox lag, beeinflusste die untersuchten Parameter in *C. elegans* mit gleicher (ROS-Akkumulation) oder nur geringfügig schwächeren Effizienz (oxidativer Stress, Lipofuszin-Akkumulation) als das Quercetin. Zur Erklärung dieser Diskrepanz können zwei Vermutungen aufgeführt werden: (i) Die Bioverfügbarkeit der Flavonoide unterscheidet sich in *C. elegans*, so dass verschiedene Konzentrationen an den jeweiligen Flavonoiden in den Zellen vorliegen und somit auch unterschiedlich starke Wirkungen ausgelöst werden können. Zur Überprüfung dieser Vermutung muss die Analyse der Aufnahme verfeinert werden, um die intrazellulären Flavonoid-Mengen genauer bestimmen zu können. (ii) Die Wirkung ist nicht (nur) von der antioxidativen Kapazität der Flavonoide bestimmt, sondern diese Substanzen vermitteln ihre Wirkung, indem sie mit diversen zellulären Signalwegen und Prozessen interagieren.

3.2.3.3 Protektive Eigenschaften

Schutz vor Stress-Bedingungen

Wie schon für Quercetin beschrieben wurde auch für Kaempferol und Fisetin untersucht, ob sie H4IIE-Zellen vor den adversen Wirkungen des H₂O₂ schützen können.

Dabei erhöhte die Vorbehandlung der Zellen mit 10 μM Fisetin die Viabilität der H_2O_2 geschädigten Zellen um etwa 50% und war damit vergleichbar protektiv gegen die H_2O_2 vermittelte Toxizität wirksam wie Quercetin (*Publikation 10*). Auch Kaempferol erhöhte die Viabilität der mit H_2O_2 behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, wobei dieser schützende Effekt erst bei etwas höheren Konzentrationen auftrat: 25 μM Kaempferol bewirkte eine ca. 50%-ige Steigerung der Viabilität, während 50 μM den Anteil der lebenden Zellen um etwa 80% an hob (*Publikation 9*).

Kaempferol und Fisetin wirkten bei einer Konzentration von 25 μM ebenfalls protektiv gegen die H_2O_2 bedingte Induktion von DNA-Strangbrüchen. Die Länge der „Kometen-Schweife“ in der Einzelzell-Gelelektrophorese wurde durch beide Flavonoide um mehr als den Faktor 2 verringert (*Publikation*). Im Vergleich zum Quercetin, das bereits bei 10 μM einen positiven Effekt auf die DNA-Schädigung bewirkte, sind diese beiden Substanzen also etwas weniger effizient.

Bei der Hemmung der H_2O_2 -induzierten Aktivierung der Caspase 3 hatte Fisetin jedoch einen mindestens gleich guten biologischen Schutzeffekt wie Quercetin. Es reduzierte die Aktivität dieser zentralen Effektor-Caspase der Apoptose auf ungefähr 30% des in der H_2O_2 -behandelten Kontrolle gemessenen Wertes (Quercetin: ca. 40% des Kontrollwertes). Kaempferol wies mit einer Reduktion der Caspase 3 Aktivität auf etwa 80% ebenfalls eine protektive Wirkung auf, die jedoch deutlich schwächer als die des Quercetins und des Fisetins war (*Publikationen 9 und 10*).

In *C. elegans* verlängerte die Kaempferol-Behandlung das mittlere Überleben der Würmer bei 37°C um 10% und zeigte eine vergleichbare protektive Wirkung gegen den letalen thermalen Stress wie das Quercetin (12% Verlängerung des Überlebens; *Publikation 2*). Fisetin erhöhte die Thermotoleranz der Würmer weniger stark und bewirkte eine Verlängerung der mittleren Überlebensspanne um nur 6%.

Auch gegen oxidativen Stress (150 μM Juglone) schützte das Kaempferol die Würmer ähnlich effizient wie das Quercetin: Die mittlere Überlebenszeit stieg durch die Behandlung von 15,8 Stunden (Kontrolle) auf 18,4 Stunden an (Quercetin: 18,9 Stunden). Im Gegensatz zu den anderen drei Flavonoiden und der Situation in den H4IIE-Zellen hatte Fisetin keinen Einfluss auf die Resistenz der Würmer gegen oxidativen Stress (unveröffentlicht).

Einfluss auf die Lebensspanne bei C. elegans

Weder für Kaempferol noch für Fisetin konnte eine Beeinflussung der Lebensspanne der Würmer unter normalen Kulturbedingungen nachgewiesen werden, so dass nur durch eine Behandlung mit Quercetin eine Verlängerung der Lebensspanne erreicht wurde.

Es ist auffällig, dass Fisetin in den Ratten-Hepatomazellen H4IIE protektive Wirkungen aufwies, die in etwa mit den starken Wirkungen des Quercetins vergleichbar waren, während dieses Flavonoid in *C. elegans* nur einen schwachen Einfluss auf die ROS-Akkumulation sowie das Ausmaß an oxidativem Stress ausübte

und nur eine geringe Erhöhung der Thermotoleranz bewirkte. Ansonsten wurden keine weiteren protektiven biologischen Eigenschaften des Fisetins in den Würmern beobachtet. Als Ursache für diesen Unterschied können mehrere mögliche Erklärungsvarianten in Betracht gezogen werden: (i) Der Speziesunterschied der beiden miteinander verglichenen Modelle kann eine abweichende Pharmakokinetik oder -dynamik des Fisetins bedingen, z. B. durch spezifische Aufnahme-mechanismen oder Proteininteraktionen in H4IIE-Zellen. Eventuell beruht die starke Wirkung des Fisetin in der Zellkultur auch auf zelltyp-spezifischen Charakteristika der H4IIE-Zellen, wie z. B. ihren Ursprung aus der Rattenleber oder auf speziellen Eigenschaften von Tumorzellen. (ii) Auch die Natur der angewandten Stress-Noxe unterscheidet sich in den beiden Systemen. Die H4IIE-Zellen wurden mit H_2O_2 geschädigt, das zunächst im Medium vorliegt und dann rasch durch Diffusion in das Zellinnere gelangt. Es ist jedoch auch möglich, dass bereits im Medium über das darin enthaltene Eisen ein Teil des H_2O_2 in Hydroxylradikale umgewandelt wird (Fenton-Reaktion). Als das Flavonoid mit der stärksten Radikalfänger-Aktivität ist Fisetin vielleicht in der Lage, diese Hydroxylradikale schon direkt im Medium abzufangen und so einen Teil seiner Wirkung extrazellulär zu vermitteln. Im Gegensatz dazu wurden die Würmer entweder mit dem Redox-Cycler Juglone behandelt oder bei $37^\circ C$ inkubiert, wodurch in beiden Fällen intrazellulär ROS generiert wurden. Eine antioxidative Wirkung des Fisetins im Kulturmedium hätte hierbei keinen Einfluss auf die ROS-Menge in den Zellen des Wurms.

Die anderen drei untersuchten Flavonoide zeigten in beiden Modellen vergleichbare Effekte. Quercetin und Kaempferol waren in *C. elegans* ähnlich effektiv in der Verringerung der ROS-Menge und der Reduktion des oxidativen Stress und wirkten sowohl in H4IIE-Zellen als auch in den Würmern protektiv gegen die verwendeten Noxen. Rutin offenbarte in beiden Systemen die geringste biologische Wirksamkeit (Ausnahme: Resistenz gegen oxidativen Stress in *C. elegans*).

3.2.3.4 Adverse Eigenschaften

Die Flavonoide Kaempferol und Fisetin wiesen in H4IIE-Zellen adverse Eigenschaften auf. Ihre zytotoxische Wirkung entfalteten sie dabei – genau wie das Quercetin – bereits bei Konzentrationen, die nur geringfügig höher waren als die protektiv wirksamen Konzentrationen waren oder sogar mit diesem schützenden Konzentrationsbereich überlappten (Kaempferol: $EC_{50, MTT} = 41 \mu M$, $EC_{50, Neutralrot} = 72 \mu M$; Fisetin: $EC_{50, MTT} = 48 \mu M$, $EC_{50, Neutralrot} = 64 \mu M$; *Publikationen 9 und 10*). Oxidativer Stress wurde allerdings nur durch Kaempferol erzeugt. Diese Substanz führte im Gegensatz zu den anderen Flavonoiden nach Behandlung der Zellen zu einer erhöhten Freisetzung von MDA als Marker für die Lipidperoxidation. Genau wie Quercetin bewirkte Kaempferol bei einer Konzentration von $50 \mu M$ die Induktion von DNA-Strangbrüche. Fisetin zeigte hierbei einen geringeren schädigenden Effekt. DNA-Strangbrüche wurden erst bei einer Konzentration von $250 \mu M$ ausgelöst.

Die Ausbildung einer DNA-Leiter als Zeichen der apoptotischen Fragmentation der genomischen DNA wurde bereits mit 50 μM Kaempferol und Fisetin beobachtet, d. h. sie vermitteln diesen pro-apoptischen Effekt bei einer geringeren Konzentration als das Quercetin (100 μM). Im Gegensatz dazu wurde kein Unterschied bei der Konzentration gefunden, die eine Steigerung der Aktivität verschiedener Caspasen bewirkte. Alle drei Flavonoide lösen diesen an der Apoptose beteiligten Prozess bei einer Konzentration von 250 μM aus (*Publikationen 9 und 10*).

In *C. elegans* wurde für diese beiden Flavonoide keine adversen Wirkungen beobachtet. Die maximale, im flüssigen Medium lösliche Konzentration von 100 μM war vermutlich nicht ausreichend, um toxische Effekte in den Würmern auszulösen.

3.2.3.5 Molekulare Wirkungen

Wie bei Quercetin führt die Behandlung der Würmer mit Kaempferol und Fisetin zu einem Rückgang der SOD-3 Expression. Fisetin hatte hierbei einen stärkeren Effekt und die beobachtete Reduktion der Fluoreszenz des Reportergens im transgenen Stamm CF1553 (86% des Kontrollwertes) entsprach dem Einfluss des Quercetins. Kaempferol bewirkte nur eine minimale (aber statistisch signifikante) Verringerung der Menge des gebildeten GFP-Fusionsproteins (94% des Kontrollwertes; unveröffentlicht).

Auch die subzelluläre Lokalisation des FoxO-Transkriptionsfaktors DAF-16 wurde durch Kaempferol und Fisetin beeinflusst (*Publikation 2*). Beide Flavonoide lösten eine Verschiebung von DAF-16 in Richtung Kern aus, der Anteil der Würmer mit einer nukleären Lokalisation erhöhte sich um den Faktor 2 bis 4, so dass der Einfluss mit dem des Quercetins vergleichbar war.

Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung des additiven Effekts von mehreren Wirkkomponenten der Flavonoide, die bereits im Zusammenhang mit der molekularen Wirkung von Quercetin diskutiert wurden (vgl. 3.2.1.5). Obwohl Kaempferol und Fisetin eine Translokation von DAF-16 in den Kern hervorriefen, wurde die Expression des Zielgens SOD-3 verringert, wobei mit dem vergleichsweise besseren Antioxidans Fisetin (entsprechend zellfreier Radikalfänger-Aktivität) eine stärkere Reduktion beobachtet wurde. Es scheint also, dass die Flavonoide sowohl über ihre antioxidative Kapazität als auch über die Beeinflussung von Signalprozessen ihre Wirkungen entfalten können und die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Flavonoide dafür entscheidend sind, über welche der Wirkkomponenten die Effekte *in vivo* vermittelt werden.

3.2.4 Wirkung von Soja-Isoflavonen in kultivierten Hepatomazellen aus Ratte und Mensch

Die geringe Inzidenz des Auftretens von verschiedenen Krebserkrankungen in der asiatischen Bevölkerung wird in Zusammenhang mit dem traditionell hohen Konsum von Sojaprodukten gesehen, die hohe Mengen der als Phytoöstrogene wirksamen Isoflavone Daidzein und Genistein enthalten [112-115]. Weiterhin werden für Daidzein und Genistein protektive Effekte bei entzündlichen Prozessen und auf das Herz-Kreislauf-System diskutiert [116, 117]. Bei der Entstehung dieser Krankheitsbilder spielt oxidativer Stress eine entscheidende Rolle.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Befunde über die antioxidative Wirkung der Soja-Isoflavone [118-121], so dass untersucht wurde, ob und wie Soja-Isoflavone in Hepatomazellen aus der Ratte (H4IIE) und dem Menschen (Huh-7 und HepG2) antioxidative Wirkungen auslösen.

3.2.4.1 Antioxidative Eigenschaften von Soja-Isoflavonen

Im zellfreien System zeigte Daidzein bis zu einer Konzentration von 300 μM keine Radikalfänger-Aktivität, während für Genistein eine geringe Aktivität festgestellt wurde (*Publikationen 6 und 7*). Die glykosylierten Soja-Isoflavone Daidzin, Genistin und Glycitin waren ebenfalls nicht in der Lage, im zellfreien System Radikale abzufangen (*Publikation 7*).

Im Gegensatz dazu waren die beiden hydroxylierten Verbindungen 3'-OH-Daidzein und 6-OH-Daidzein, die durch Oxidation während des Phase I Metabolismus (Cytochrom P450 Enzyme) entstehen [122], als Radikalfänger ähnlich wirksam wie die Referenzsubstanz Trolox (*Publikation 7*).

3.2.4.2 Zytotoxizität von Soja-Isoflavonen

Die beobachtete Zytotoxizität der einzelnen Soja-Isoflavonoide bzw. ihrer Glykoside und Hydroxy-Metabolite war unterschiedlich und variierte in den verwendeten Zellen.

In den Ratten Hepatoma-Zellen H4IIE wies Genistein mit einem EC_{50} -Wert von circa 50 μM die höchste Zytotoxizität auf. Das glykosylierte Genistein-Derivat Genistin zeigte erst bei einer Konzentration von 100 μM einen toxischen Effekt, während Daidzein und die Glykoside Daidzin sowie Glycitin (bis 100 μM) keine Zytoxizität aufwiesen. Die beiden hydroxylierten Daidzein-Metabolite 3'-OH-Daidzein und 6-OH-Daidzein zeigten erst bei den physiologisch irrelevanten Konzentrationen von 300 und 500 μM eine toxische Wirkung auf die Zellen (*Publikation 7*).

Die beiden humanen Hepatoma-Zelllinien waren deutlich unterschiedlich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Daidzein. In Huh-7 Zellen waren bereits 50 μM Daidzein

toxisch und der EC₅₀-Wert betrug ungefähr 90 µM, während die HepG2 Zellen erst bei 300 µM Daidzein einen toxischen Effekt erkennen ließen (*Publikation 6*).

3.2.4.3 Einfluss von Daidzein auf die Katalase

Da Daidzein keine Radikalfänger-Aktivität aufwies, aber dennoch ein antioxidativer Effekt diskutiert wird (s. o.), wurde spekuliert, dass dieses Isoflavon seine Wirkung über die Verstärkung des endogenen antioxidativen Enzymsystems vermittelt. Die Katalase hat innerhalb dieses Enzymverbands eine wichtige Funktion, indem sie die Disproportionierung von H₂O₂ zu Wasser und Sauerstoff katalysiert. Die Menge an Katalase-Transkripten wird in verschiedenen Zelltypen durch H₂O₂ und andere ROS erzeugende Substanzen erhöht [123-125]. Auch durch Quercetin und das im Rotwein enthaltene Polyphenol Resveratrol wurde eine Zunahme der Katalase mRNA beobachtet [109, 126]. Über die molekularen Gründe für diese Zunahme finden sich in der Literatur verschiedene Vermutungen. Clerch *et al.* postulieren eine Steigerung der Stabilität der Katalase-Transkripte durch die Bindung eines redox-sensitiven Proteins an die 3'-UTR (3' untranslatierte Region) in der Ratten-Lunge [109, 127, 128]. Auch in anderen Studien wird eine posttranskriptionale Regulation der Katalase beschrieben [123, 129]. Neno *et al.* hingegen schliessen aus ihren Ergebnissen an humanen Leukämiezellen, dass die Regulation der Katalase-Expression hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene stattfindet [130]. In H4IIE-Zellen wird ebenfalls von einer transkriptionellen Kontrolle der Katalase-Expression berichtet [118].

Daidzein erhöht in H4IIE-Zellen die Menge an Katalase-Transkripten um 34% (200 µM) bzw. 57% (300 µM), wie durch Northern Blot Hybridisierungen gezeigt wurde (*Publikation 7*). Die verstärkte Expression dieses Enzyms kann eventuell die diskutierten antioxidativen Wirkungen des Daidzeins (s. o.) bedingen. Es war daher von Interesse zu untersuchen, wie dieses Soja-Isoflavon die Zunahme der Katalase-Transkripte steuert. Zu diesem Zweck wurden Reporter-Experimente in Hepatomazellen aus der Ratte und dem Menschen durchgeführt.

Dabei konnte auf Vorarbeiten von Röhrdanz *et al.* zurückgegriffen werden [118], die den Einfluss von Daidzein auf ein 1,1 kB großes Promotorkonstrukt der Ratten-Katalase untersucht haben und eine Induktion der Aktivität dieses Promotorbereichs durch 50 µM und 100 µM Daidzein feststellten. Allerdings wurden die Reporter-Experimente dabei in humanen HepG2-Zellen, also in einem heterologen System, durchgeführt, weil mit den Ratten H4IIE-Zellen keine ausreichend hohe Transfektions-Effizienz erzielt werden konnte. Dieses Problem wurde durch Anwendung des „*particle bombardment*“-Verfahrens überwunden, bei dem die Reporter-Konstrukte in die Zellen eingebracht werden, indem DNA-beschichtete Goldpartikel mit hohem Druck auf die Zellen geschossen werden. Außerdem wurde neben dem 1,1 kB Fragment zwei größere Promotorkonstrukte von 3,5 kB und 2,7 kB hergestellt und in die Untersuchung mit eingeschlossen (*Publikation 7*). Die größeren Promotorfragmente zeigten eine deutlich höhere Aktivität unter basalen

Bedingungen, d. h. ohne Daidzein-Behandlung der Zellen, als das 1,1 kB-Fragment. Daidzein bewirkte jedoch bei allen drei Konstrukten eine Steigerung der Promotoraktivität um etwa den Faktor zwei (für das 1,1 kB-Fragment statistisch nicht signifikant). Dieses Ergebnis ist weitgehend im Einklang mit den Befunden von Röhrdanz *et al.* [118] sowie dem Ergebnis aus den Northern Blot Hybridisierungen. Auch für den Promotor der humanen Katalase wurden unterschiedliche Reporterkonstrukte (Abb. 3.4) hergestellt und in humanen Huh-7 und HepG2 Zellen bezüglich ihrer basalen Aktivität sowie ihrer Beeinflussbarkeit durch Daidzein untersucht (Publikation 6). Das Konstrukt mit dem 0,3 kB langen Promotorfragment (pGL0,3kBCatProm) wies unter basalen Bedingungen, d. h. ohne Daidzein, eine höhere transkriptionelle Aktivität auf als die beiden Konstrukte mit den längeren Fragmente (pGL3,2kBCatProm und pGL2,0kBCatProm). Hieraus ergab sich die Annahme, dass innerhalb des 0,3 kB-Fragments die wesentlichen Elemente für die basale Transkription der Katalase lokalisiert sind. Durch die Deletion dieses Bereichs

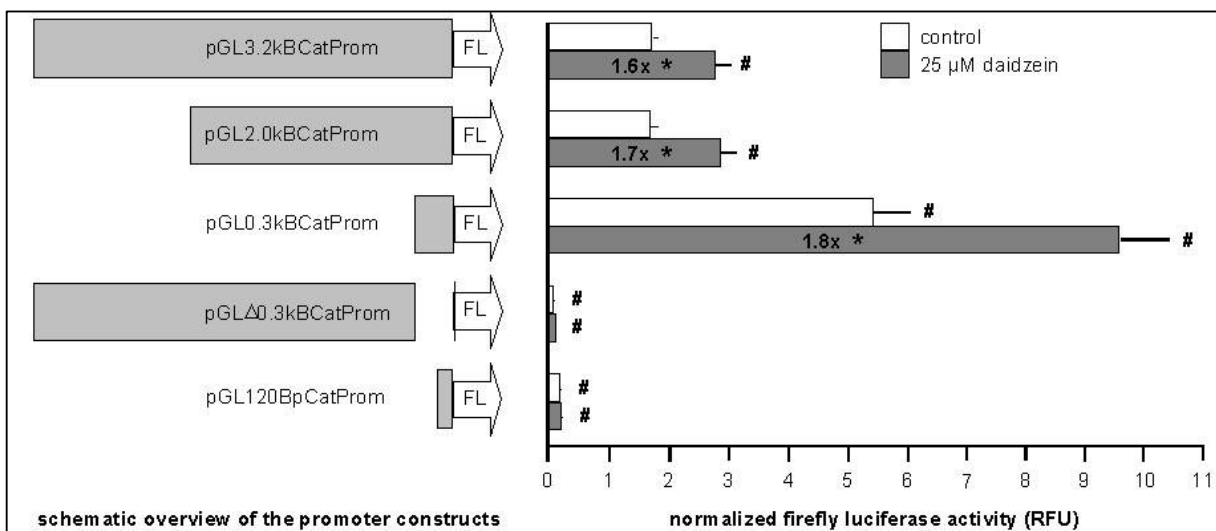


Abbildung 3.4:

Schematische Darstellung der Promotorkonstrukte und ihrer transkriptionellen Aktivität in humanen HepG2 Zellen. Die Promotorfragmente wurden vor die Kodierregion der Glühwürmchen-Luziferase (*firefly luciferase*, FL) kloniert und regulieren somit ihre Transkription. Die Expression der Glühwürmchen-Luziferase unter basalen Bedingungen (*control*) und nach Inkubation der HepG2 Zellen mit 25 µM Daidzein wurde anhand ihrer Chemilumineszenz quantifiziert. Die Zahlenwerte geben den Faktor der Zunahme der Chemilumineszenz an. #: $P < 0,05$ gegen pGL3,2kBCatProm ohne Daidzein-Inkubation; *: $P < 0,05$ gegen die entsprechende Kontrolle

aus dem 3,2 kB Promotorfragment wurde dies bestätigt. Das entsprechende Promotoronstrukt (pGLΔ0,3kBCatProm) war nahezu ohne transkriptionelle Aktivität. Der Bereich mit den für die transkriptionelle Aktivität ausschlaggebenden DNA-Elementen wurde durch ein weiteres Promotorkonstrukt (pGL120BpCatProm) weiter eingegrenzt, das nur die – vom Startkodon aus gesehen 5'-gelegenen – ersten 120 bp des Katalase-Promotors enthielt und ebenfalls nur eine sehr geringe Promotoraktivität aufwies. Die entscheidenden Sequenzmotive für die transkriptionelle Aktivität des humanen Promotors müssen also in dem Bereich zwischen Position 120 und

300 stromaufwärts (in 5'-Richtung) vom Startkodon gelegen sein. Eine Analyse der Sequenz dieses DNA-Abschnitts sagte das Vorhandensein diverser regulatorischer Motive vorher, u. a. mehrerer putativer Bindestellen für Sp1-, NF-Y und AP-1 (Abb. 3.5, Publikation 6). In humanen Leukämie-Zellen wurde ein ähnlicher Bereich des Katalase-Promotors als verantwortlich für die Promotoraktivität identifiziert [130]. In

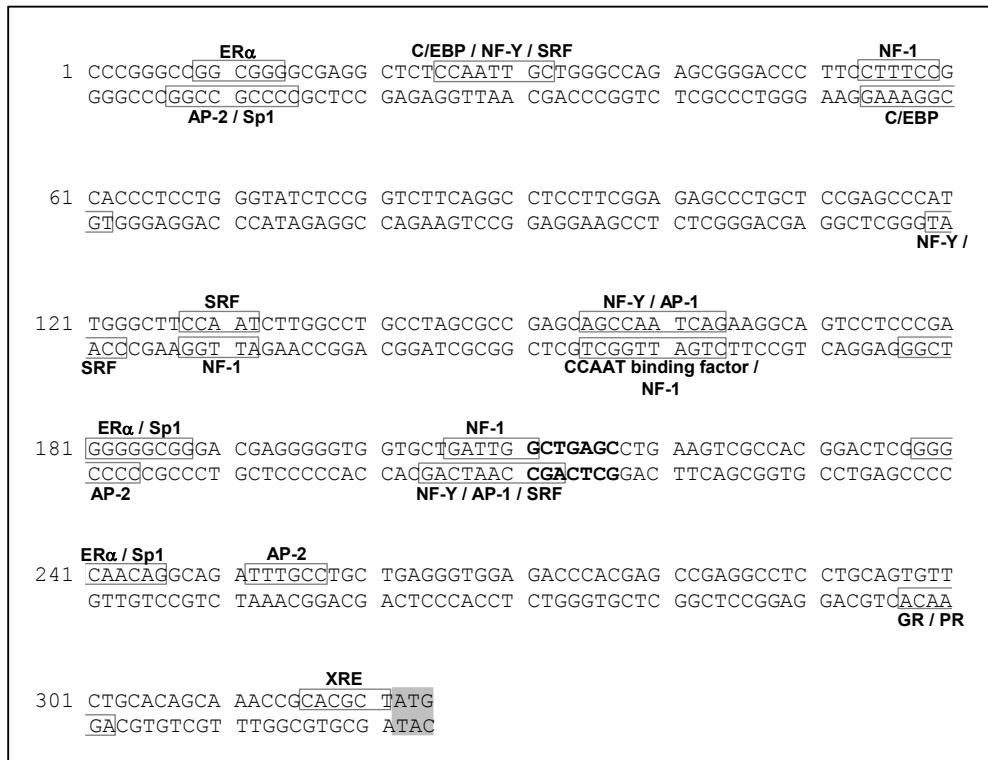


Abbildung 3.5:

Sequenzanalyse des 0,3 kB-Fragments aus dem Promotor der humanen Katalase. Dargestellt ist die doppelsträngige DNA-Sequenz des 0,3 kB-Fragments aus dem Promotor der humanen Katalase mit den putativen Bindestellen (grau umrandete Boxen) und bindenden Faktoren (in fett über und unter der Nukleotidsequenz) in der jeweiligen Orientierung (oberer Strang: 5' → 3', unterer Strang: 3' → 5'). Die fett gedruckte Nukleotidsequenz gibt die Restriktionsschnittstelle an, die zur Konstruktion des 120 Bp-Fragments im Vektor pGL120BpCatProm verwendet wurde. Das Startcodon der Katalase-Gens ist grau hinterlegt. AP-2: Aktivator Protein 2 (TESS - TRANSFAC Factor Records T00035 and T02466), C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein (T00581 and T00583), ERα: Östrogen-Rezeptor (T00261), GR: Glucocorticoid-Rezeptor (T00337 and T01920), NF-1: nuclear factor-1 (T00539), NF-Y: nuclear factor-Y (T00150), PR: Progesteron-Rezeptor (T00696), Sp1: simian-virus 40 Protein-1 (T00759), SRF: serum response factor (T00764), XRE: xenobiotic response element (ooTFD database: s00395)

dieser Studie wurde weiterhin gezeigt, dass die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und NF-Y ausschlaggebend für die basale Transkription ist. Die Induktion der Transkription durch Daidzein erfolgte in den drei Promotorkonstrukten, die den 0,3 kB Bereich vollständig enthalten, in etwa im gleichen Ausmaß – der Faktor der Induktion betrug jeweils 1,6 bis 1,8. Die Reporterexpression im Konstrukt pGLΔ0,3kBcatProm entsprach in etwa der des Kontrollvektors (pGL3 Basic), der keine Promotorsequenz beinhaltet. Ohne diese 0,3 kB Region wies der verbliebene

Promotor also unabhängig von der Behandlung der Zellen keine Aktivität auf. Die 120 Bp-Sequenz im Konstrukt pGL120BpCatProm vermittelte zwar eine etwas höhere Expression des Reportergens und zeigte somit eine geringe Promotoraktivität. Eine Induktion der Aktivität durch Daidzein konnte jedoch nicht gemessen werden. In Huh-7 Zellen wurde die transkriptionelle Aktivität des Konstrukts mit dem 3,2 kB Promotorfragment (pGL3,2kBCatProm) durch Daidzein ebenfalls um das 1,6-Fache erhöht. Allerdings war in diesen Zellen die Aktivität des Reporterkonstruktes sowohl unter basalen Bedingungen als auch bei Daidzein-Induktion deutlich geringer als in HepG2 Zellen, so dass keine weiteren Untersuchungen in diesen Zellen durchgeführt wurden (Publikation 6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression der Katalase in Hepatomazellen aus der Ratte und dem Menschen über transkriptionelle Mechanismen reguliert wird und die Transkription in beiden Spezies durch Daidzein gesteigert wird. Hierdurch wird jedoch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass Daidzein oder andere Substanzen bzw. Einflüsse auch die Stabilität der Katalase-Transkripte verändern und auf diese Weise wirksam sind. Allerdings wurde die Enzymaktivität der Katalase durch die Behandlung mit Daidzein von HepG2 Zellen um das 1,6-Fache erhöht (Publikation 6), d. h. um etwa den gleichen Faktor, mit dem Transkription gesteigert wurde. Dies legt nahe, dass Daidzein (überwiegend) über eine Induktion der Transkription die Menge bzw. die Aktivität der Katalase erhöht.

4. Literaturverzeichnis

1. Hertog, M. G. (1996) Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc. Nutr. Soc.* 55, 385-397
2. Beecher, G. R. (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.* 133, 3248S-3254S
3. Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B. und Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 342, 1007-1011
4. Price, K. R. und Rhodes, M. J. C. (1997) Analysis of the Major Flavonol Glycosides Present in Four Varieties of Onion (*Allium cepa*) and Changes in Composition Resulting from Autolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74, 331-339
5. Hollman, P. C. H. und Arts, I. C. W. (2000) Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1081-1093
6. Keys, A. (1980) Wine, garlic, and CHD in seven countries. *Lancet* 19, 145-146
7. Kris-Etherton, P., Eckel, R. H., Howard, B. V., St Jeor, S. und Bazzarre, T. L. (2001) AHA Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation.* 103, 1823-1825
8. Richard, J. L. (1987) Coronary risk factors. The French paradox. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 80 Spec, 17-21
9. Renaud, S. und de Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 20, 1523-1526
10. Williams, R. J., Spencer, J. P. und Rice-Evans, C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* 36, 838-849
11. SKLM (2007) DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (Vorsitzender: G. Eisenbrand): Aspekte potentiell nachteiliger Wirkungen von Polyphenolen/Flavonoiden zur Verwendung in isolierter oder angereicherter Form. In: G. Eisenbrand (Ed), Lebensmittel und Gesundheit II. Band 7, Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (DFG), Wiley-VCH, Weinheim
12. Shay, N. F. und Banz, W. J. (2005) Regulation of gene transcription by botanicals: novel regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 297-315
13. Watzl, B. und Rechkemmer, G. (2001) Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 48, 498-502
14. Williamson, G. und Manach, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 243S-255S
15. Voisine, C., Varma, H., Walker, N., Bates, E. A., Stockwell, B. R. und Hart, A. C. (2007) Identification of potential therapeutic drugs for huntington's disease using *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE.* 2, e504
16. Pu, P. und LE, W. D. (2006) *C. elegans* as a model system for Parkinson disease. *Neurosci. Bull.* 22, 124-128
17. Kaletta, T. und Hengartner, M. O. (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 387-399
18. Gami, M. S. und Wolkow, C. A. (2006) Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan. *Aging Cell.* 5, 31-37
19. Lewis, J. A. und Fleming, J. T. (1995) Basic Culture Methods. In: Epstein H. F., Shakes, D. C. (Eds.), *Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism*. Vol. 48 Methods in Cell Biology, Academic, San Diego, 4-30
21. The C.elegans Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018
22. Kuwabara, P. E. und O'Neil, N. (2001) The use of functional genomics in *C. elegans* for studying human development and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 24, 127-138

23. Friedman, D. B. und Johnson, T. E. (1988) A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics*. 118, 75-86
24. Gill, M. S. (2006) Endocrine targets for pharmacological intervention in aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 5, 23-30
25. Braungart, E., Gerlach, M., Riederer, P., Baumeister, R. und Hoener, M. C. (2004) *Caenorhabditis elegans* MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neurodegener. Dis.* 1, 175-183
26. Wu, Z., Smith, J. V., Paramasivam, V., Butko, P., Khan, I., Cypser, J. R. und Luo, Y. (2002) Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48, 725-731
27. Strayer, A., Wu, Z., Christen, Y., Link, C. D. und Luo, Y. (2003) Expression of the small heat-shock protein Hsp-16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761. *FASEB J.* 17, 2305-2307
28. Smith, J. V. und Luo, Y. (2004) Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 465-472
29. Smith, J. V. und Luo, Y. (2003) Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. *J. Alzheimers Dis.* 5, 287-300
30. Luo, Y. (2006) Alzheimer's disease, the nematode *Caenorhabditis elegans*, and ginkgo biloba leaf extract. *Life Sci.* 78, 2066-2072
31. Gutierrez-Zepeda, A., Santell, R., Wu, Z., Brown, M., Wu, Y., Khan, I., Link, C. D., Zhao, B. und Luo, Y. (2005) Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *BMC. Neurosci.* 6,
32. Brown, M. K., Evans, J. L. und Luo, Y. (2006) Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and alpha-lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85, 620-628
33. Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M. und Sinclair, D. (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686-689
34. Fridovich, I. (1978) Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Photochem. Photobiol.* 28, 733-741
35. Cross, A. R. und Jones, O. T. (1991) Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim. Biophys. Acta* 1057, 281-298
36. Patel, M. und Day, B. J. (1999) Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 359-364
37. Colton, C. und Zahari, S. (1997) Role of free radicals in alcohol-induced tissue injury. In: Baskin, S. I. und Salem H. (Eds), *Oxidants, Antioxidants and Free Radicals*. Taylor and Francis, Washington and London. 259-271
38. Gutteridge, J. M. und Halliwell, B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 136-147
39. Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. Aufl. Clarendon Press, Oxford
40. Bruskov, V. I., Malakhova, L. V., Masalimov, Z. K. und Chernikov, A. V. (2002) Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucl. Acids Res.* 30, 1354-1363
41. Venkatesan, B., Mahimainathan, L., Das, F., Ghosh-Choudhury, N. und Ghosh, Choudhury G. (2007) Downregulation of catalase by reactive oxygen species via PI 3 kinase/Akt signaling in mesangial cells. *J. Cell. Physiol.* 211, 457-467
42. Bast, A. und Goris, R. J. (1989) Oxidative stress. Biochemistry and human disease. *Pharm. Weekbl. Sci.* 11, 199-206
43. Girotti, A. W. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529-1542
44. Guengerich, F. P. (1988) Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 48, 2946-2954
45. Bock, K. W., Lilienblum, W., Fischer, G., Schirmer, G. und Bock-Henning, B. S. (1987) The role of conjugation reactions in detoxication. *Arch. Toxicol.* 60, 22-29
46. Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213-219

47. Hayes, J. D., Flanagan, J. U. und Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.* 45:51-88., 51-88
48. Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 916-921
49. Beckman, K. B. und Ames, B. N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78, 547-581
50. Forsberg, L., de Faire, U. und Morgenstern, R. (2001) Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 389, 84-93
51. Wallace, D. C. (1992) Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256, 628-632
52. Warner, H. R. (1994) Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* 17, 249-258
53. Davies, K. J. (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1-31
54. Sayre, L. M., Smith, M. A. und Perry, G. (2001) Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.* 8, 721-738
55. Penta, J. S., Johnson, F. M., Wachsmann, J. T. und Copeland, W. C. (2001) Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat. Res.* 488, 119-133
56. Prusiner, S. B. (2001) Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N. Engl. J. Med.* 344, 1516-1526
57. Harman, D. (1956) Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300
58. Finkel, T. und Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247
59. Barazzoni, R., Short, K. R. und Nair, K. S. (2000) Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart. *J. Biol. Chem.* 275, 3343-3347
60. Sugrue, M. M. und Tatton, W. G. (2001) Mitochondrial membrane potential in aging cells. *Biol Signals Recept.* 10, 176-188
61. Drouet, M., Lauthier, F., Charmes, J. P., Sauvage, P. und Ratinaud, M. H. (1999) Age-associated changes in mitochondrial parameters on peripheral human lymphocytes. *Exp. Gerontol.* 34, 843-852
62. de Grey, A. D. (1997) A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. *Bioessays* 19, 161-166
63. de Grey, A. D. (2000) The reductive hotspot hypothesis: an update. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 295-301
64. Liebau, E., Wildenburg, G., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (1994) A novel type of glutathione S-transferase in *Onchocerca volvulus*. *Infect. Immun.* 62, 4762-4767
65. Liebau, E., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (1994) *Onchocerca volvulus*: isolation and sequence of a second glutathione S-transferase cDNA. *Exp. Parasitol.* 79, 68-71
66. Liebau, E., Eschbach, M. L., Tawe, W., Sommer, A., Fischer, P., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (2000) Identification of a stress-responsive theta-class *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase (*Ov-GST-3*) by RT-PCR differential display. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109, 101-110
67. Krause, S., Sommer, A., Fischer, P., Brophy, P. M., Walter, R. D. und Liebau, E. (2001) Gene structure of the extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* and its overexpression and promoter analysis in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117, 145-154
68. O'Brien, P. J. (1991) Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 80, 1-41
69. Redmond, D. L., Clucas, C., Johnstone, I. L. und Knox, D. P. (2001) Expression of *Haemonchus contortus* pepsinogen in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112, 125-131
70. Britton, C. und Murray, L. (2002) A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 21-33

71. Kwa, M. S., Veenstra, J. G., Van Dijk, M. und Roos, M. H. (1995) Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 246, 500-510
72. Gilleard, J. S. (2004) The use of *Caenorhabditis elegans* in parasitic nematode research. *Parasitology*. 128, S49-S70
73. Tawe, W. N., Eschbach, M. L., Walter, R. D. und Henkle-Dührsen, K. (1998) Identification of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display. *Nucleic Acids Res* 26, 1621-1627
74. Link, C. D. und Johnson, C. J. (2002) Reporter transgenes for study of oxidant stress in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol.* 353:497-505., 497-505
75. Henderson, S. T., Bonafe, M. und Johnson, T. E. (2006) daf-16 protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med Sci.* 61, 444-460
76. DeFeudis, F. V. (2002) Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on gene expression: Possible relevance to neurological disorders and age-associated cognitive impairment. *Drug Development Research* 54, 214-235
77. Le Bars, P. L., Velasco, F. M., Ferguson, J. M., Dessain, E. C., Kieser, M. und Hoerr, R. (2002) Influence of the severity of cognitive impairment on the effect of the Gnkgo biloba extract EGb 761 in Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* 45, 19-26
78. Gohil, K. (2002) Genomic responses to herbal extracts: lessons from in vitro and in vivo studies with an extract of *Ginkgo biloba*. *Biochem. Pharmacol.* 64, 913-917
79. Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S. und Johnson, T. E. (1995) Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7540-7544
80. Larsen, P. L. (1993) Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90, 8905-8909
81. Vanfleteren, J. R. (1993) Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 292 (Pt 2), 605-608
82. Sampayo, J. N., Jenkins, N. L. und Lithgow, G. J. (2000) Using stress resistance to isolate novel longevity mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908, 324-326
83. Munoz, M. J. und Riddle, D. L. (2003) Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity. *Genetics.* 163, 171-180
84. de Castro, E., de Castro, S. H. und Johnson, T. E. (2004) Isolation of long-lived mutants in *Caenorhabditis elegans* using selection for resistance to juglone. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 139-145
85. Gill, M. S., Olsen, A., Sampayo, J. N. und Lithgow, G. J. (2003) An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 558-565
86. Darr, D. and Fridovich, I. (1995) Adaptation to oxidative stress in young, but not in mature or old, *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 195-201
87. Honda, Y. und Honda, S. (1999) The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 13, 1385-1393
88. Kenyon, C. (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell.* 120, 449-460
89. Libina, N., Berman, J. R. und Kenyon, C. (2003) Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell.* 115, 489-502
90. Garigan, D., Hsu, A. L., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J. und Kenyon, C. (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics.* 161, 1101-1112
91. Gerstbrein, B., Stamatias, G., Kollias, N. und Driscoll, M. (2005) In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 4, 127-137
92. Wilson, M. A., Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Ingram, D. K., Joseph, J. A. und Wolkow, C. A. (2006) Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 5, 59-68
93. Baumeister, R., Schaffitzel, E. und Hertweck, M. (2006) Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *J. Endocrinol.* 190, 191-202

94. Wang, Y. und Tissenbaum, H. A. (2006) Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech. Ageing Dev.* 127, 48-56
95. Wang, Y., Oh, S. W., Deplancke, B., Luo, J., Walhout, A. J. und Tissenbaum, H. A. (2006) *C. elegans* 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO. *Mech. Ageing Dev.* 127, 741-747
96. Oh, S. W., Mukhopadhyay, A., Svrzikapa, N., Jiang, F., Davis, R. J. und Tissenbaum, H. A. (2005) JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4494-4499
97. Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A. L., Orosz, L. und Müller, F. (2003) Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426, 620-620
98. Henderson, S. T. und Johnson, T. E. (2001) daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 11, 1975-1980
99. Morris, B. J. (2005) A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer. *J. Hypertens.* 23, 1285-1309
100. Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P. C., de Vries, J. H. und Katan, M. B. (2002) Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J. Am. Diet. Assoc.* 102, 1414-1420
101. Walle, T. (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 829-837
102. Spencer, J. P. (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.* 133, 3255S-3261S
103. Spencer, J. P., Abd-el-Mohsen, M. M. und Rice-Evans, C. (2004) Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 148-161
104. Stahl, W., van den Berg H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R. M., Gartner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., Kelly, F. J., Polidori, M. C., Rice-Evans, C., Southon, S., van Vliet, T., Vina-Ribes, J., Williamson, G. und Astley, S. B. (2002) Bioavailability and metabolism. *Mol. Aspects Med.* 23, 39-100
105. Lindblom, T. H. und Dodd, A. K. (2006) Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.* 305, 720-730
106. Gems, D. und McElwee, J. J. (2005) Broad spectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/IGF-1 signaling? *Mech. Ageing Dev.* 126, 381-387
107. Boege, F., Straub, T., Kehr, A., Boesenberg, C., Christiansen, K., Andersen, A., Jakob, F. und Kohrle, J. (1996) Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 271, 2262-2270
108. Watjen, W., Chovolou, Y., Kampkotter, A. und Kahl, R. (2006) Anti- and prooxidative effects of flavonoids. In: *Leading Edge Antioxidant Research* (Editor: H.V. Panglossi), Nova Science Publishers, Inc., New York. ISBN 1-60021-274-3
109. Rohrdanz, E., Bittner, A., Tran-Thi, Q. H. und Kahl, R. (2003) The effect of quercetin on the mRNA expression of different antioxidant enzymes in hepatoma cells. *Arch. Toxicol.* 77, 506-510
110. Manach, Claudine, Scalbert, Augustin, Morand, Christine, Remesy, Christian und Jimenez, Liliana (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-747
111. Jaganath, I. B., Mullen, W., Edwards, C. A. und Crozier, A. (2006) The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radic. Res.* 40, 1035-1046
112. Kandaswami, C., Lee, L. T., Lee, P. P., Hwang, J. J., Ke, F. C., Huang, Y. T. und Lee, M. T. (2005) The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo.* 19, 895-909
113. Limer, J. L. und Speirs, V. (2004) Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res.* 6, 119-127
114. Morrissey, C. und Watson, R. W. (2003) Phytoestrogens and prostate cancer. *Curr. Drug Targets.* 4, 231-241
115. Messina, M., McCaskill-Stevens, W. und Lampe, J. W. (2006) Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *J. Natl. Cancer Inst.* 20, 1275-1284
116. Chin-Dusting, J. P., Fisher, L. J., Lewis, T. V., Piekarska, A., Nestel, P. J. und Husband, A. (2001) The vascular activity of some isoflavone metabolites: implications for a cardioprotective role. *Br. J. Pharmacol.* 133, 595-605

117. Suthar, A. C., Banavalikar, M. M. und Biyani, M. K. (2001) Pharmacological activities of Genistein, an isoflavone from soy (*Glycine max*): part I--anti-cancer activity. *Indian J. Exp. Biol.* 39, 511-519
118. Rohrdanz, E., Ohler, S., Tran-Thi, Q. H. und Kahl, R. (2002) The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells. *J. Nutr.* 132, 370-375
119. Hodgson, J. M., Puddey, I. B., Croft, K. D., Mori, T. A., Rivera, J. und Beilin, L. J. (1999) Isoflavonoids do not inhibit in vivo lipid peroxidation in subjects with high-normal blood pressure. *Atherosclerosis.* 145, 167-172
120. Hundhausen, C., Bosch-Saadatmandi, C., Augustin, K., Blank, R., Wolffram, S. und Rimbach, G. (2005) Effect of vitamin E and polyphenols on ochratoxin A-induced cytotoxicity in liver (HepG2) cells. *J. Plant Physiol.* 162, 818-822
121. Tang, X., Zhang, C., Zeng, W., Mi, Y. und Liu, H. (2006) Proliferating effects of the flavonoids daidzein and quercetin on cultured chicken primordial germ cells through antioxidant action. *Cell. Biol. Int.* 30, 445-451
122. Kulling, S. E., Honig, D. M. und Metzler, M. (2001) Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3024-3033
123. Rohrdanz, E. und Kahl, R. (1998) Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 27-38
124. Rohrdanz, E., Obertriffter, B., Ohler, S., Tran-Thi, Q. H. und Kahl, R. (2000) Influence of Adriamycin and paraquat on antioxidant enzyme expression in primary rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 74, 231-237
125. Rohrdanz, E., Schmuck, G., Ohler, S., Tran-Thi, Q. H. und Kahl, R. (2001) Changes in antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide in rat astroglial cells. *Arch. Toxicol.* 75, 150-158
126. Li, Y., Cao, Z. und Zhu, H. (2005) Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol. Res.* 53, 6-15
127. Clerch, L. B. (1995) A 3' untranslated region of catalase mRNA composed of a stem-loop and dinucleotide repeat elements binds a 69-kDa redox-sensitive protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 267-274
128. Clerch, L. B. und Massaro, D. (1992) Oxidation-reduction-sensitive binding of lung protein to rat catalase mRNA. *J. Biol. Chem.* 267, 2853-2855
129. Pedraza-Chaverri, J., Granados-Silvestre, M. D., Medina-Campos, O. N., Maldonado, P. D., Olivares-Corichi, I. M. und Ibarra-Rubio, M. E. (2001) Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Mol. Cell. Biochem.* 216, 9-19
130. Neno, M., Ichimura, S., Mita, K., Yukawa, O. und Cartwright, I. L. (2001) Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. *Cancer Res.* 61, 5885-5894

5. Lebenslauf

Dr. rer. nat. Dietmar Andreas Kampkötter

- Geburtsdatum:** am 16. Januar 1969 in Düsseldorf, Deutschland
- Familienstand:** verheiratet
- Kinder:** Niels Felix Kampkötter, geb. am 15. April 2000
Lars Domenic Kampkötter, geb. am 20. Juli 2003
- Staatsangehörigkeit:** deutsch
- Schulbildung:** 1975-1979 Gemeinschaftsgrundschule, Düsseldorf
1979-1988 Annette von Droste-Hülshoff Gymnasium, Düsseldorf
1988 Abitur
- Wehrdienst:** 1988-1989 Nachschubkompanie 160, Hamburg
- Studium:** 1989-1995 Studium der Biologie an der HHU Düsseldorf
Diplomarbeit bei Prof. Dr. Werner Kunz, Institut für Genetik, HHU Düsseldorf:
Untersuchung geschlechtsspezifischer Merkmale bei Schistosoma mansoni
- Studienabschluss:** Juli 1995 Diplombiologe
- Promotion:** 1995-1999 Durchführung der Dissertationsarbeit am Institut für Genetik, HHU Düsseldorf bei Prof. Dr. Werner Kunz:
Identifizierung und Charakterisierung eines Ras-Homologen und ein Ansatz zur Untersuchung differentieller Genexpression bei Schistosoma mansoni
Promotionsprüfung am 22. Januar 1999

beruflicher Werdegang:

- | | |
|--------------|---|
| 1993-1995 | Studentische Hilfskraft an der HHU Düsseldorf |
| 1995-1998 | Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Genetik, HHU Düsseldorf (Promotion) |
| 1999-2001 | Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Genetik, HHU Düsseldorf |
| 2001-2007 | Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Toxikologie, HHU Düsseldorf |
| ab Okt. 2007 | Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Toxikologie, HHU Düsseldorf |

6. Ausgewählte Original- und Übersichtsartikel

Der Inhalt dieser Habilitationsschrift ist in Teilen in den folgenden Publikationen veröffentlicht worden.

1. Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R. F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P. und Wätjen, W. (2008) Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149, 314-323
2. Kampkötter, A., Gombitang, N. C., Zurawski, R. F., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W. und Kahl, R. (2007) Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Toxicology* 81, 849-858
3. Kampkötter, A., Gombitang-Nkwonkam, C., Zurawski, R. F., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W. und Kahl, R. (2007) Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* 234, 113-123
4. Kampkötter, A., Pielarski, T., Rohrig, R., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W. und Kahl, R. (2007) The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological Research* 55, 139-147.
5. Barthel, A., Ostrakhovitch, E. A., Walter, P. L., Kampkötter, A. und Klotz, L. O. (2007) Stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling by copper and zinc ions: mechanisms and consequences. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 463, 175-182
6. Kampkötter, A., Wiegand, C., Timpel, C., Röhrdanz, E., Chovolou, Y., Kahl, R. und Wätjen, W. (2008) Increased expression of catalase in human hepatoma cells by the soy isoflavone daidzein. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 102, 437-42. Erratum in: *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* (2008) 102, 489
7. Kampkötter, A., Chovolou, Y., Kulawik, A., Röhrdanz, E., Weber, N., Proksch, P. und Wätjen, W. (2008) Antioxidative effects of the isoflavonoid daidzein in rat H4IIE cells: upregulation of catalase. *Nutrition Research* 28, 620-628
8. Walter, P. L., Kampkötter, A., Eckers, A., Barthel, A., Schmoll, D., Sies, H. und Klotz, L. O. (2006) Modulation of FoxO signaling in human hepatoma cells by exposure to copper or zinc ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 454, 107-113.
9. Niering, P., Michels, G., Wätjen, W., Ohler, S., Steffan, B., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Proksch, P. und Kahl, R. (2005) Protective and detrimental effects of kaempferol in rat H4IIE cells: implication of oxidative stress and apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 209, 114-122.

10. Wätjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Tran-Thi, Q. H., Proksch, P. und Kahl, R. (2005) Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *Journal of Nutrition*. 135, 525-531.
11. Kampkötter, A., Volkmann, T. E., de Castro, S. H., Leiers, B., Klotz, L. O., Johnson, T. E., Link, C. D. und Henkle-Dührsen, K. (2003) Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (Ov-GST-3): a parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*. 325, 25-37.
12. Leiers, B., Kampkötter, A., Grevelding, C. G., Link, C. D., Johnson, T. E. und Henkle-Dührsen, K. (2003) A stress-responsive glutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*. 34, 1405-1415.